Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundvierzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1924

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin-Dahlem, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin-Dahlem, K. Hess-Berlin-Dahlem, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Ostwald-Leipzig, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, T. Sasaki-Tokio, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanasawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, E. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, A. v. Wassermann-Berlin, E. Widmark-Lund, W. Wichowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundvierzigster Band

Erstes und zweites Heft

Ausgegeben am 23. Februar 1924



Berlin
Verlag von Julius Springer
1924

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band im Umfange von 36—40 Bogen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen, um unliebsame Überraschungen zu vermeiden.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

---

145. Band. **Inhaltsverzeichnis.** **Heft 1/2.**

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Über die Wirkung des Jodäthylurethans und -allophanats.

Von

B. v. Issekutz und A. Tukats.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Kgl. ungarischen Universität in Szeged.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1923.)

Das Äthylurethan, welches in den achtziger Jahren des vorigen Jahrhunderts in die Therapie als gänzlich unschädliches Hypnotikum mit großen Hoffnungen eingeführt wurde, rief — da sich seine Wirksamkeit für zu schwach und ungewiß erwies — große Enttäuschungen hervor. Obgleich sich viele mit der Frage beschäftigten, die Wirksamkeit dieser Verbindung zu steigern, und obwohl es ihnen auch glückte, neuere, stärker wirkende Carbaminsäureester (Hedonal, Aponal) herzustellen, welche sich in der Heilkunde ihrer stärkeren Wirksamkeit wegen für nützlicher wiesen, hat bisher niemand die Brom- und Jodsubstitutionsprodukte des Äthylurethans hinsichtlich ihrer Wirkung und ihres Verhaltens im Organismus untersucht.

Das Jodäthylurethan ($NH_2-CO-O-C_2H_4J$) ist ein weißes, kristallinisches Pulver von etwas beißendem Geschmack. Löst sich im Wasser gut. Auf 60° erwärmt, kann eine 5proz. Lösung bereitet werden; enthält 59,07 Proz. Jod.

1,0 mg pro Gramm in den Bauchlymphsack des Frosches eingespritzt, verursacht während einer halben Stunde oberflächliche Narkose, welche sich langsam steigert und lange anhält, so daß das Tier auch noch am nächsten Tage matt ist. Nach der Einspritzung gehen die Frösche den darauffolgenden zweiten bis vierten Tag gewöhnlich zugrunde. 2,0 mg pro Gramm rufen am Frosche tiefe Narkose hervor, indem die Reflexe vollkommen aufgehoben werden. Nächsten Tag besteht noch Lähmung bei schwacher Herztätigkeit, und den dritten Tag geht das Tier zugrunde. Das auf der *Straub*schen Kanüle befestigte — isolierte — Froschherz wird vom Jodäthylurethan nur in der Verdünnung 1 : 1000 beeinflußt, erzeugt Arrhythmie, meistens Halbierung des Pulses, so daß auf 2 As 1 Vs fällt. Die Wirkung ist reversibel: Wenn wir das Herz mit *Ringer*scher Lösung auswaschen, hört die Arrhythmie auf, tritt aber auf neuere Vergiftung wieder ein.

Bei Mäusen verursacht 1,0 mg pro Gramm Jodäthylurethan, unter die Haut gespritzt, innerhalb 5 Minuten Narkose, welche ständig tiefer wird und schließlich, infolge Lähmung der Atmung, mit dem Tode endet. 0,5 mg pro Gramm verursacht keine Narkose, nur einigermaßen Müdigkeit, und doch verenden die Tiere am nächsten Tag; 0,3 mg pro Gramm hingegen vertragen sie ohne jede Beschwerde und bleiben dauernd gesund.

Bei Kaninchen und Katzen erwies sich diese Verbindung als noch giftiger. Bei beiden Tieren wirkten schon 0,3 g pro Kilogramm tödlich. Gewöhnlich zeigt sich eine an den hinteren Gliedmaßen beginnende und weiter zunehmende Lähmung; z. B.

Versuch Nr. 2. Katze, 1550 g schwer, erhielt am:

18. Februar 1921, 11 Uhr 50 Min., 0,50 g Jodäthylurethan = 0,33 g pro Kilogramm subkutan. 12 Uhr 40 Min. kann sie auf den Rücken gelegt werden, wendet sich langsam zurück.
19. Februar frißt sie nicht, ist müde, sieht krank aus.
21. Februar wiegt sie 1400 g. Hochgradige Muskelschwäche, vermag die hinteren Gliedmaßen kaum zu bewegen, schleppt sie nach, stützt sich auf die vorderen Gliedmaßen, stürzt bald zusammen und vermag auch den Kopf kaum zu heben.
22. Februar wiegt sie 1320 g, frißt nicht und wird immer schwächer.
27. Februar in der Frühe finden wir sie tot.

Wenn die Tiere täglich Jodäthylurethan erhalten, so wirkt schon eine bedeutend kleinere Dosis, 0,08 g pro Kilogramm, tödlich.

Versuch Nr. 5. Katze, 3350 g, erhielt am:

23. Februar 1921 0,20 g Jodäthylurethan per os = 0,06 g pro Kilogramm.
24. Februar 0,30 g Jodäthylurethan per os = 0,09 g pro Kilogramm.
26. Februar wiegt sie 3200 g, frißt gut und ist gesund.
28. Februar wiegt sie 3100 g, 0,25 g Jodäthylurethan = 0,08 g pro Kilogramm.
1. März wiegt sie 3100 g, 0,25 g Jodäthylurethan = 0,08 g pro Kilogramm, frißt zwar gut, nimmt aber ständig ab.
17. März wiegt sie 2550 g, 0,20 g Jodäthylurethan = 0,08 g pro Kilogramm.
18. März 0,20 g Jodäthylurethan.
22. bis 24. März erhält sie täglich 0,20 g Jodäthylurethan.
25. März wiegt sie 2300 g, frißt nicht, ist schwach, geht taumelnd.
30. März kann sie sich kaum bewegen, besonders gelähmt ist der hintere Körperteil.
31. März in der Frühe finden wir sie tot.

0,05 g pro Kilogramm ist diejenige größte Tagesdosis, welche der Organismus auch bei ständiger Einnahme verträgt; z. B.

Versuch Nr. 8. Katze, 2200 g schwer, erhält vom:

29. März bis 10. Mai 1921 42 Tage hindurch täglich 0,10 g Jodäthylurethan = 0,048 g pro Kilogramm per os. Bleibt ständig gesund, ihr Körpergewicht nimmt nicht ab.

Versuch Nr. 9. Katze, 2000 g schwer, erhält vom:

20. April bis 10. Mai 1921 20 Tage hindurch täglich 0,10 g Jodäthylurethan = 0,05 g pro Kilogramm. Ihr Körpergewicht sinkt auf 1500 g, sonst bleibt sie gesund.

Mit Jodäthylurethan wurden bei paralytischen Kranken vorsichtig Versuche angestellt. Anfangs erhielten sie täglich 0,45 g, später 0,75 g; diese Dosen erwiesen sich auch bei längerer Einnahme als unschädlich. Vereinzelt zeigen sich Magenbeschwerden und Appetitlosigkeit infolge seines beißenden Geschmackes und seiner lokalreizenden Eigenschaften wegen.

Nicht nur die Jod-, sondern auch die Bromverbindung des Äthylurethans ist ziemlich giftig.

Das Bromäthylurethan ist ein weißes, kristallinisches, in Wasser leicht lösliches Pulver.

1,0 mg pro Gramm verursacht an Fröschen oberflächliche Narkose. Das Tier bleibt in Rückenlage, kehrt sich aber auf Kneifen um. Nach einigen Stunden hört die Narkose auf und dennoch gehen bis nächsten Tag alle Tiere zugrunde. 2,0 mg pro Gramm verursachen eine vollkommene tiefe Narkose, die Reflexe bleiben vollständig aus und die Narkose endet mit dem Tode des Tieres.

Äthylurethan verursacht an Fröschen in Dosen von 2,0 mg pro Gramm oberflächliche, und in Dosen von 4,0 mg pro Gramm tiefe Narkose. Also steigert die Bromierung die narkotische Wirkung auf das Zweifache. Bedeutend stärker wächst indes die Giftigkeit der Verbindung, denn während das Äthylurethan überhaupt nicht giftig ist — nach sehr großen Dosen auch nach mehrere Tage hindurch anhaltender Narkose genesen die Tiere alle —, tötet auch schon die kleinste narkotisierende Dosis des Bromäthylurethans die Tiere. Wir finden auch bei Säugetieren ähnliche Verhältnisse: 0,5 g pro Kilogramm erzeugen beim Kaninchen und bei der Katze gleichfalls oberflächliche, 1 bis 2 Stunden andauernde Narkose, aus der das Tier erwacht, jedoch matt bleibt, kranken Eindruck macht und bis nächsten Tag verendet. Ähnlich verhält sich auch das Bromäthyl. Die damit narkotisierten Tiere erwachen zwar rasch, doch erkranken sie nach kürzerer oder längerer Zeit schwer und gehen zugrunde. *W. Hennicke*[1]) wies sogar nach, daß jene Ratten, die in einer kaum narkotisch wirkenden 2vol.-proz. Konzentration des Bromäthyls gehalten wurden, am nächsten Tage zugrunde gehen.

Zwecks Verminderung der Giftigkeit und des unangenehmen Geschmacks des Jodäthylurethans wurde die Acetylverbindung hergestellt ($CH_3CO—NH—CO . OC_2H_4J$).

Diese geschmacklose Verbindung erwies sich aber gegen Erwarten giftiger als das Jodäthylurethan: schon 0,3 mg pro Gramm wirkten bei Mäusen tödlich, von Jodäthylurethan ist die Dosis letalis 0,5 mg pro Gramm.

Es glückte indes, die Giftigkeit der Verbindung durch Einführung der $OC—NH_2$-Gruppe bedeutend herabzusetzen. Die so erhaltene Substanz ist das Jodäthylallophanat ($NH_2CO—NH—CO . OC_2H_4J$), ein weißes, vollkommen geschmackloses kristallinisches Pulver, welches

[1]) *W. Hennicke*, Inaug.-Dissert. Bonn 1895; zit. nach *Kochmann*, Handb. d. Pharm. 1, 261.

in Wasser wenig, jedoch in Alkohol, Aceton, Essigäther gut löslich ist; enthält 49,2 Proz. Jod.

In den Bauchlymphsack des Frosches in Form einer Emulsion eingespritzt, sind 1,0 bis 1,5 mg pro Gramm noch wirkungslos, 2,0 mg pro Gramm erzeugen geringe Mattigkeit, später Lähmung und rufen nach 2 bis 3 Tagen den Tod des Tieres hervor.

Bei Mäusen erwies sich 1,0 mg pro Gramm in Form einer Emulsion als tödlich.

Das Jodäthylallophanat erwies sich auch an Kaninchen und Katzen bei weitem weniger giftig als das Jodäthylurethan. Die tödliche Dosis des ersteren ist nämlich 0,70 g pro Kilogramm und die des letzteren 0,30 g. Noch größer ist der Unterschied, wenn wir diejenigen Versuche vergleichen, während deren die Tiere Wochen hindurch Jodäthylurethan bzw. -allophanat erhielten. Vom ersteren war die noch nicht giftig wirkende Tagesdosis 0,05 g, vom letzteren hingegen 0,20 g[1]), somit also viermal größer.

Versuch Nr. 6. Kaninchen, 2000 g schwer, erhält vom 7. bis 21. Februar 1918 täglich 0,4 g Jodäthylallophanat = 0,2 g pro Kilogramm. Bleibt dauernd gesund, sein Körpergewicht nimmt während der 14tägigen Behandlung um 300 g ab.

Versuch Nr. 7. Kaninchen, 1850 g schwer, erhält vom 20. Februar bis 20. März 1921 täglich 0,2 g Jodäthylallophanat = 0,10 g pro Kilogramm. Bleibt dauernd gesund, sein Körpergewicht bleibt unverändert.

Die Giftigkeit des Jodäthylallophanats entspricht der des Jodivals, von dem nach den Versuchen von *Eckhout*[2]) die Dosis letalis ebenfalls 0,7 g pro Kilogramm ist, die des Jodkaliums nach *Sgalitzer*[3]) 1,2 g.

Bedeutend kleiner ist hingegen der Unterschied, wenn wir das Jodäthylallophanat bei chronischer Dosierung mit Jodnatrium vergleichen. *Buchholz*[4]) gab in seinen Versuchen täglich dreimal je 0,13 g Jodkalium (= 0,39 g pro Kilogramm) und den dritten Tag verendete der Hund. Dieselbe Dosis, dem Kaninchen verabreicht, verursacht den siebenten Tag den Tod des Tieres. In unseren Versuchen vernichtete die täglich verabreichte etwas größere Dosis (von 0,55 g pro Kilogramm) des Jodäthylallophanats den vierten Tag das Kaninchen. Das Jodäthylallophanat ist also eine wenig giftige Verbindung. Seine Giftigkeit ist bei chronischer Dosierung unbedeutend größer als die der Jodsalze, ist in den in der Therapie angewendeten Gaben (täglich 1 bis 3 g) nicht schädlich.

Verteilung im Organismus.

Zur Bestimmung des Jodgehaltes im Organismus stehen uns mehrere Methoden zur Verfügung.

Am häufigsten wird die *Baumann*sche Methode angewendet, bei der das Organ mit Kalilauge und Kaliumnitrat verascht wird. Die Asche wird mit Wasser entlaugt, das Jod aus der angesäuerten Lösung mit Nitrit ausgeschieden und mit Chloroform oder Kohlenschwefel ausgeschüttelt. Der Jodgehalt der letzteren wird entweder mit Kolorimetrie bestimmt

[1]) Entspricht, auf den Menschen umgerechnet, täglich 12 g.
[2]) *Eckhout*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **57**, 338, 1907.
[3]) *Sgalitzer*, Arch. intern. **18**, 285.
[4]) *Buchholz*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **81**, 288, 1917.

oder nach *Fresenius* mit Natriumthiosulfat titriert. Die Veraschung der Organe fordert sehr große Vorsicht, denn der Salpeter fängt leicht Flamme und es verbrennt die ganze Masse, währenddem der größte Teil des Jods entweicht. Auch bei der größten Vorsicht kann kaum vorgebeugt werden, daß einzelne kleinere Teile sich nicht entzünden, so daß ein kleinerer oder größerer Jodverlust immer erwächst. Die Jodbestimmung ist weder durch Kolorimetrie, noch nach *Fresenius* genügend pünktlich, wie das *Blum* und *Grützner*[1]) in ihren eindringlichen Studien nachgewiesen haben, weshalb wir den größten Teil der Jodbestimmung nach Methode der Genannten ausgeführt haben. Die Veraschung der Organe mit Bariumsuperoxyd gelingt sehr leicht und glatt. Den Überfluß reduzieren wir mit Tierkohle und lösen aus der Asche mit Wasser die löslichen Bestandteile. Die Jodbestimmung geschieht nach der von *Bernier* und *Peron* empfohlenen Methode dermaßen, daß wir die Jodide in alkalischer Lösung mit Kaliumpermanganat zu jodsauren Salzen oxydieren, das jodsaure Salz mit Schwefelsäure in Anwesenheit von Jodkalium zersetzen und das freiwerdende Jod mit Natriumthiosulfat titrieren. Die Methode gibt sehr genaue Resultate, wenn wir die von *Blum* und *Grützner* empfohlenen Änderungen einhalten. Unsere Kontrollversuche führten wir so aus, daß wir zu Muskelstücken und zu Gehirn bekannte Mengen Jodkalium gaben, diese veraschten und das darin befindliche Jod bestimmten. Auf diese Art überzeugten wir uns, daß auch $^{1}/_{10}$, ja sogar $^{1}/_{100}$ mg Jodmenge mit der gewünschten Genauigkeit bestimmt werden konnte. Wiederholt veraschten wir Organe ohne Zugabe von Jod, um uns über die Reinheit unserer Chemikalien überzeugen zu können.

Das Resultat unserer Versuche ist aus der Tabelle I ersichtlich. Die Verteilung des mit Jodäthylurethan und -allophanat eingeführten Jods im Organismus unterscheidet sich von der der Jodide wesentlich. Die Jodionen der letzteren sind, wie *Löb*[2]) nachwies, nicht imstande, in das Gehirn-, Fettgewebe und Knochenmark einzudringen; diese Organe der mit Jodnatrium behandelten Kaninchen bleiben immer jodfrei. Jodäthylurethan und -allophanat hingegen verhalten sich ähnlich wie das von *Löb* untersuchte Jodäthyl und Jodanilin. Im Gehirn und Fettgewebe der mit Jodäthylurethan und -allophanat behandelten Tiere gelang es in jedem Falle, Jod nachzuweisen. Das Gehirn enthält jedoch immer bedeutend weniger Jod als das Blut und die Leber, in denen während der meisten Versuche ungefähr gleiche Jodmengen gefunden wurden. Der Jodgehalt des Gehirns hingegen war nur $^{1}/_{4}$ bis $^{1}/_{10}$ jener Jodmenge.

Zur Kontrolle dessen, ob sich das Jodäthylallophanat vollständig resorbiert, wurde in den Versuchen Nr. 3, 8, 10 der Tabelle I der ganze Darminhalt und Fäzes gesammelt und daraus die noch nicht resorbierte Jodmenge bestimmt. Im Versuch Nr. 3 erhielt das Tier 1,24 g Jodäthylallophanat. Nach $6^{1}/_{2}$ Stunden wurde das Tier durch Verblutung getötet. Im ganzen Magen- und Darminhalt fanden wir 0,028 g Jod = 0,056 g Jodäthylallophanat. Demnach wurden 95,5 Proz. der verabreichten Menge

[1]) *Blum* und *Grützner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 429, 1913.
[2]) *O. Loeb*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **56**, 320, 1907.

Tabelle I.

Nr.	Substanz	Tier	Dosis	mg Jod in 100 g Organen: Blut	Leber	Gehirn	Fett Gewicht	Niere	Lunge	Hoden	Muskel	Thymus	Eiter	Bemerkungen
1	Jodäthyl-urethan	Kaninchen 1600 g	0,3 g pro kg subkutan	29,0	5,0	1,3	4,0	3,0	—	—	—	—	20,0	Verendete den vierten Tag nach der Injektion. An der Injektionsstelle blutige, sulzige, wässerige Stelle in großer Ausbreitung.
2	Jodäthyl-urethan	Katze 1550 g	0,33 g pro kg subkutan	5,0	16,5	1,8	—	—	—	—	—	—	3,6	Verendete den neunten Tag nach der Injektion.
3	Jodäthyl-urethan	Kaninchen 1350 g	0,3 g pro kg per os	20,0	14,0	5,0	—	10,4	—	—	—	—	—	Verendete den zweiten Tag.
4	Jodäthyl-urethan	Kaninchen 1450 g	2 . 0,10 g pro kg	5,2	1,8	1,4	—	—	—	—	—	—	—	Verendete innerhalb drei Tagen.
5	Jodäthyl-urethan	Katze 3350 g	0,08 g pro kg	2,0	—	0,3	—	—	—	—	—	—	—	Verendete eine Woche nach der letzten Dosis.
2	Jodäthyl-allophanat	Kaninchen 1600 g	0,775 g pro kg per os	13,0	16,0	1,5	—	—	—	—	—	—	—	Verendete während 20 Stunden.
3	Jodäthyl-allophanat	Kaninchen 1600 g	0,775 g pro kg per os	8,0	9,0	0,7	1,2	—	—	—	—	—	—	6½ Stunden nach dem Eingeben durch Verblutung getötet.
8	Jodäthyl-allophanat	Kaninchen 1900 g	3 . 0,55 g pro kg per os	37,0	22,2	3,1	—	25,0	25,0	9,5	8,0	—	—	Verendete während vier Tagen.
9	Jodäthyl-allophanat	Kaninchen 1750 g	0,7 g pro kg in die Lunge	22,7	—	4,9	—	—	—	—	—	—	—	
10	Jodäthyl-allophanat	Katze 1500 g	0,7 g pro kg per os	13,3	23,0	1,9	1,6	—	7,6	—	—	2,6	—	Verendete während 20 Stunden.

resorbiert. Ähnlich wurden in den Versuchen Nr. 8 und 20 97,3 bzw. 97,5 Proz. der verabreichten Menge resorbiert.

Um einen Vergleich mit den in der Therapie gebräuchlichen organischen Jodverbindungen anstellen zu können, wurden mit einem 6½ kg schweren Hunde Versuche angestellt.

Der Hund erhielt von der untersuchten Substanz früh 8 Uhr vor dem Fressen per os eine 0,50 bis 0,75 g Jod entsprechende Menge. Im Stoffwechselkäfig wurde sein Kot und Urin täglich gesammelt und das Jod daraus bestimmt. Die Beobachtungen wurden fortgesetzt, so lange Jod im Urin nachgewiesen werden konnte. Nachher bekam das Tier 3 Tage Rast. Bald darauf wurden mit einer anderen Substanz Versuche genau unter denselben Umständen angestellt. Im Durchschnitt erhielt das Tier jeden zehnten Tag eine Dosis Jod. Die Versuche sind in der Tabelle II zusammengefaßt. Während vom eingegebenen Jodkalium bloß 0,43 Proz. nicht resorbiert wurden — so viel wurden im Kot gefunden —, erwies sich die Resorbierung der Fettsäure-Jodverbindungen als sehr unvollkommen. So wurden in einem Falle von Sajodin 43,8 Proz., im anderen Falle 17,7 Proz., von Lipojodin 19,4 und 13,8 Proz., vom Dijodyl 44,5 Proz. nicht resorbiert. Vom Jodäthylallophanat verblieben im Kote 2,15 Proz., vom Alival 0,40 Proz. Das Alival erwies sich indes für sehr giftig; 1,2 g = 0,19 g pro Kilogramm töteten das Tier innerhalb einiger Stunden und verhinderte dadurch die Ausbreitung der Versuche auf andere Substanzen.

Die Ausscheidung des Jods mit dem Urin dauerte beim Jodkalium 3, bei den übrigen 4 bis 6 Tage. Die ausgeschiedene Jodmenge des Jodkaliums betrug 85 Proz. des Eingegebenen, bei den übrigen betrug sie 24 bis 58 Proz. Diese Versuche bestätigen demnach

Tabelle II.

Tag	0,97 g Jodkalium = 0,74 g Jod		Sajodin 2,5 g = 0,625 g Jod		Sajodin 2,5 g = 0,625 g Jod		Lipojodin 1,8 g = 0,738 g Jod		Lipojodin 1,8 g = 0,738 g Jod		Dijodyl 1,2 g = 0,574 g Jod		Jodäthylallophanat 1 g = 0,49 g Jod		Alival 1,2 g = 0,75 g Jod	
	Urin	Kot	Urin	Kot	Urin	Kot	Urin	Kot	Urin	Kot	Urin	Kot	Urin	Kot	Urin	Kot
1.	0,594	—	0,118	—	0,230	—	0,315	—	0,179	—	0,0126	—	0,151	—	Im ganzen Darminhalt 0,003 g Jod = 0,4 Proz.	Das Tier verendete nach 5 Stunden
2.	0,030	0,0032	0,021	—	0,036	0,111	0,046	0,1435	0,157	—	0,126	—	0,092	0,0106		
3.	0,006	0	0,006	0,274	0,018	—	0,029	—	0,066	—	0,038	0,256	0,020	—		
4.	0	0	0,004	0	0,007	0	0,012	0	0,020	0,102	0	—	0,008	0		
5.	—	—	0	—	0	—	0,008	0	0,003	0	0	—	0,001	—		
6.	—	—	0	—	—	—	0,007	—	0,002	—	0	—	0,0006	0		
7.	—	—	—	—	—	—	0	—	0	—	—	—	0	—		
	0,630 g J = 85,1 Proz.	0,0032 g J = 0,43 Proz.	0,149 g J = 23,9 Proz.	0,274 g J = 43,8 Proz.	0,291 g J = 46,5 Proz.	0,111 g J = 17,7 Proz.	0,417 g J = 56,4 Proz.	0,1435 g J = 19,4 Proz.	0,427 g J = 57,8 Proz.	0,102 g J = 13,8 Proz.	0,177 g J = 30,7 Proz.	0,256 g J = 44,5 Proz.	0,2726 g J = 55,3 Proz.	0,0106 g J = 2,15 Proz.	—	—

die Resultate von *Keeser*[1]), *Hoss*[2]) und *Wolf*[3]), die ebenfalls konstatierten, daß die Fettsäure-Jodverbindungen im Darmtrakt unvollkommen resorbiert werden. Das Jodäthylallophanat unterscheidet sich aus diesem Standpunkte vorteilhaft von dem Vorhergehenden, denn es wird beinahe quantitativ resorbiert.

Bei *Menschen* geschieht die Ausscheidung mit ähnlicher Geschwindigkeit wie die der Jodide. Einer von uns nahm auf nüchternen Magen zuerst 0,32 g Jodkalium und nach einigen Tagen ebensoviel (0,245 g) Jod enthaltendes (0,50 g) Jodäthylallophanat; die mit dem Urin ausgeschiedene Jodmenge stieg folgendermaßen:

Jodkalium	g	Im Durchschnitt einer Stunde g
Innerhalb einer 1/2 Stunde	0,0024	—
" 1 "	0,0180	0,018
" 2 Stunden	0,035	0,017
" 4 "	0,085	0,020
" 8 "	0,135	0,0125
" 12 "	0,168	0,0055
" 18 "	0,199	0,005
" 24 "	0,217	0,003

Jodäthylallophanat	g	Im Durchschnitt einer Stunde g
Innerhalb einer 1/2 Stunde	0,0013	—
" 1 "	0,0023	0,0023
" 2 Stunden	0,0065	0,0042
" 4 "	0,0485	0,021
" 8 "	0,124	0,019
" 12 "	0,162	0,006
" 18 "	0,202	0,0066
" 24 "	0,222	0,0033

wurden mit dem Urin ausgeschieden.

Die Ausscheidung des in Form von Jodäthylallophanat eingeführten Jods beginnt langsamer als das Jodkalium, in der vierten Stunde hingegen hört der Unterschied auf, und von da an geschieht die Ausscheidung in beiden Versuchen mit gleicher Geschwindigkeit. Die Ausscheidung der Jodmenge betrug während 24 Stunden 86 bzw. 88 Proz.

Zusammenfassung.

1. Die Giftigkeit des Äthylurethans wird durch Einführung von Brom und Jod in die Äthylgruppe stark gesteigert; die weitere Steigerung der Giftigkeit wird von der Acetylierung verursacht.

---

[1]) *Keeser*, Zeitschr. f. klin. Med. **91**, 61, 1921.
[2]) *Hoss*, Inaug.-Dissert. Gießen 1914.
[3]) *Wolf*, Inaug.-Dissert. Gießen 1914.

2. Das Jodäthylallophanat ist weniger giftig als das Jodäthylurethan und ist in der in der Therapie in Betracht kommenden Dosis unschädlich.

3. Beide Verbindungen sind von lipotroper und neurotroper Eigenschaft.

4. Die Fettsäure-Jodverbindungen werden im Darmtrakt sehr unvollkommen, hingegen wird das Jodäthylallophanat beinahe quantitativ resorbiert.

5. Das Jodäthylallophanat wird mit dem Urin beinahe in demselben Maße und so rasch ausgeschieden wie das Jodkalium.

Über den Einfluß des Sauerstoffgehaltes auf die Wasserstoffzahl des Blutes.

Von

J. Holló und St. Weiss.

(Aus der I. medizinischen Klinik der Páznány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 11. Dezember 1923.)

Hasselbalch und *Lundsgard* (1) haben zuerst darauf hingewiesen, daß Oxyhämoglobin eine stärkere Säure ist als reduziertes Hämoglobin.

Dieser Befund ist dann besonders von *Henderson*[2]) eingehend ergründet worden. Damit erklärt es sich, daß arterialisiertes Blut bei gleicher Kohlensäurespannung etwas saurer ist als reduziertes; diese Tatsache ist von *Hasselbalch* und *Lundsgard* (1), *Hasselbalch* (3), *Christiansen, Douglas* und *Haldane* (4), *Henderson* (2) sowie von *Parsons* (5) in mehreren — allerdings nicht vielen — Fällen durch Untersuchung des Kohlensäurebindungsvermögens ermittelt worden. Der Unterschied zwischen der Reaktion des reduzierten und des oxygenisierten Blutes bei gleicher Kohlensäurespannung hängt vom Hämoglobingehalt des Blutes sowie von der CO_2-Spannung ab, bei welcher untersucht wurde; er beträgt, unter physiologischen Bedingungen bei 38° C untersucht, p_H 0,02 bis 0,03.

Dieser Befund ist sowohl vom physiologischen wie vom methodischen Gesichtspunkte aus wichtig. Da die Kohlensäurespannung im venösen Blute höher als im arteriellen ist, so ist venöses Blut saurer; dieser Unterschied wird aber zum guten Teile ausgeglichen, eben dadurch, daß Oxyhämoglobin eine stärkere Säure ist als reduziertes Hämoglobin; diesem Umstande ist es zu verdanken, daß das zirkulierende Venenblut unter normalen Bedingungen nur um etwa p_H 0,02 saurer ist, als das arterielle Blut [*Christiansen, Douglas* und *Haldane* (4)]. Die technische Bedeutung dieses Verhaltens des Hämoglobins ist besonders von *Peters, Barr* und *Rule* (6) hervorgehoben worden: Bei den gebräuchlichen Methoden zur Ermittlung der Kohlensäurebindungskurve wird das Blut beim Schütteln im Kohlensäure-Luftgemisch des Tonometers arterialisiert; dadurch entsteht, da gewöhnlich venöses Blut gebraucht wird, ein Fehler. Wird die Bindungskurve zur Berechnung der p_H benutzt, speziell aber nach der Methode von *Haggard* und *Henderson* (7), wo der Kohlensäuredruck aus der Gesamtkohlensäure und aus der Bindungskurve ermittelt wird, so können dadurch ganz falsche Werte entstehen, so daß zu solchen Berechnungen unbedingt eine auf den Hämoglobingehalt und Oxygensättigung des venösen Blutes bezogene Korrektur notwendig wird.

Alle die bisher erwähnten Befunde sind an *defibriniertem* Blute ermittelt worden; um so beachtenswerter muß es also erscheinen, daß *Haggard* und *Henderson* (7) bei Benutzung von *Oxalatblut* keinen Unterschied zwischen Bindungsvermögen des oxygenisierten und reduzierten Blutes finden konnten. [Bekanntlich hat Oxalat in den benutzten Konzentrationen keinen Einfluß auf das Bindungsvermögen und p_H des Blutes. *Corral* (9), *van Slyke* und *Cullen* (10), *Peters*, *Barr* und *Rule* (6).] *Haggard* und *Henderson* haben in drei Fällen das Oxalatblut mit CO_2-Gemischen von derselben CO_2-Spannung ins Gleichgewicht gebracht, die das eine Mal jedoch mit Luft, das andere Mal aber mit reinem N_2 bzw. H_2 verdünnt wurden. Sie konnten dabei im Bindungsvermögen der verschieden vorbehandelten (oxygenisierten bzw. reduzierten) Blutproben keinen Unterschied finden. Derselbe Versuch, jedoch mit defibriniertem Blute, ergab dagegen den bekannten Unterschied.

Diese Verschiedenheit im Verhalten des defibrinierten und des Oxalatblutes konnte zwar von *Joffe* und *Poulton* (11), sowie — allerdings auf indirektem Wege — von *Peters*, *Barr* und *Rule* (6) nicht bestätigt werden, doch haben wir uns bei der Wichtigkeit der Frage auch unsererseits veranlaßt gefühlt, diesen Befund nachzuprüfen, und um so mehr, weil auch wir bei unserer kürzlich mitgeteilten kolorimetrischen Methode zur Bestimmung der Wasserstoffzahl des Blutes (12) mit Oxalatblut, und zwar mit oxygenisiertem Venenblut arbeiten, und weil wir eben durch die von uns angegebene einfache und genaue Technik in der Lage sind, diese Frage ohne besondere Mühe und an einer größeren Zahl von Fällen, als dies bisher insgesamt geschah, zu untersuchen.

Bei unserem Verfahren wird das frisch entnommene Venenblut zu allererst mit CO_2-freier physiologischer NaCl + Na-Oxalatlösung verdünnt (1 : 10). Um oxygenisierte und reduzierte Portionen desselben Blutes untersuchen zu können, haben wir die zur Verdünnung der verschiedenen Blutportionen benutzten Lösungen das eine Mal durch Durchströmen mit reinem O_2, das andere Mal mit reinem N_2 bzw. H_2, von ihrem Kohlensäuregehalt befreit; die mit N_2 bzw. H_2 durchströmte Verdünnungsflüssigkeit ist durch diese Manipulation oxygenfrei geworden, während der mit O_2 durchströmte Teil mit O_2 gesättigt wurde.

Durch zehnfache Verdünnung mit einer mit O_2 gesättigten Lösung wird das venöse Blut jedenfalls vollständig oxygenisiert, da die durch die Verdünnung zugeführte O_2-Menge etwa 27 Vol.-Proz. — bezogen auf das Blutvolumen — beträgt (Absorptionskoeffizient von O_2 bei Zimmertemperatur = 0,03, O_2-Gehalt der gesättigten Lösung = 3 Proz., 9 . 3 = 27).

Dagegen ist die Reduktion, die das venöse Blut durch zehnfache Verdünnung mit O_2-freier Lösung erfährt, ziemlich unbedeutend (1 bis 2 Vol.-Proz.), da nur etwa $^1/_{50}$ Teil des O_2 im Blute physikalisch gelöst ist. Die von uns untersuchten Blutproben entsprechen also in ihrem

O_2-Gehalt dem arteriellen bzw. (mit einer kleinen Korrektur) dem venösen Blute.

Wir haben auf diese Weise die Blut-p_H von 16 Menschen untersucht, die in den uns interessierenden Punkten für normal gelten können. Wir haben immer mit drei Kontrollen gearbeitet, die untereinander bis auf 5 Proz. übereinstimmten.

Tabelle I.

Blut-p_H bei 18° C.

	O_2	N_2	H_2
Sine morbo	7,52	7,55	—
„ „	7,50	—	7,535
Ulcus duodeni	7,53	—	7,56
Neurasthenia	7,525	7,56	7,575
Arteriosclerosis	7,60	7,63	7,63
„	7,535	7,59	7,58
Sine morbo	7,55	7,60	7,605
Ulcus duodeni	7,59	7,64	7,63
Hyperaciditas	7,58	7,61	—
Sine morbo	7,59	7,63	—
„ „	7,54	7,59	—
„ „	7,54	7,58	—
Cat. apicis	7,51	7,57	—
Sine morbo	7,50	7,53	—
Cat. apicis	7,56	7,61	—
Sine morbo	7,51	7,56	—

Wir haben also, im Gegensatz zu *Haggard* und *Henderson*, gefunden, daß auch oxygenisiertes *Oxalatblut* saurer ist als reduziertes *Oxalatblut*. Der Unterschied wechselt von p_H 0,03 bis p_H 0,06, *im Durchschnitt beträgt er* p_H *0,043*.

Die bisherigen Unterschiedswerte in der Literatur beziehen sich meistens auf arterielles und (fast) *vollständig* reduziertes Blut. *Hasselbalch* (3), der defibriniertes Blut bei einem O_2-Drucke von 139 mm bzw. 38 mm (entsprechend dem arteriellen und venösen Blute), bei einem CO_2-Drucke von 40 mm untersucht hat, fand einen Unterschied von p_H 0,02.

Unsere Unterschiedswerte für die Reaktion von oxygenisiertem (arterialisiertem) und reduziertem (venösem) Blute sind also höher als die bisherigen in der Literatur. Diese Verschiedenheit ist wohl damit zu erklären, daß wir erstens bei Zimmertemperatur gearbeitet haben, vielmehr aber noch dadurch, daß wir die verschiedenen Blutportionen nicht bei demselben CO_2-*Drucke*, sondern bei demselben CO_2-*Gehalt* (die Verdünnung des Blutes geschah in geschlossenen Röhren ohne Gasraum!) untersucht haben.

Die für unsere Originalmethode zur Bestimmung der Blut-p_H mittels Indikatoren bei Verdünnung des Blutes mit *oxygenisierter*

Lösung anzuwendende Korrektur ergibt sich aus unseren Untersuchungen auf p_H 0,04. Diese Korrektur muß zu den erhaltenen Werten addiert werden. Benutzt man zur Verdünnung des Blutes eine O_2-freie Lösung — was uns aus technischen Gründen leider nicht ständig möglich ist —, so ist die Anwendung einer Korrektur überflüssig.

Zusammenfassung.

Venöses Oxalatblut wird durch Arterialisation bei unverändertem Gesamtkohlensäuregehalt im Durchschnitt um p_H 0,04 saurer.

Literatur.

1) *Hasselbalch* und *Lundsgard*, diese Zeitschr. **88**. — 2) *Henderson*, Journ. of biol. Chem. **41**. — 3) *Hasselbalch*, diese Zeitschr. **78**. — 4) *Christiansen, Douglas* und *Haldane*, Journ. of Phys. **48**. — 5) *Parsons*, ebendaselbst **51** und **58**. — 6) *Peters, Barr* und *Rule*, Journ. of biol. Chem. **45**. — 7) *Haggard* und *Henderson*, ebendaselbst **39**. — 8) *Dieselben*, ebendaselbst **45**. — 9) *Corral*, diese Zeitschr. **72**. — 10) *van Slyke* und *Cullen*, Journ. of biol. Chem. **80**. — 11) *Joffe* und *Poulton*, Journ. of Phys. **54**. — 12) *Holló und Weiss*, diese Zeitschr. **144**, 87, 1924.

Über den Abbau der Stärke durch Salze.

Von

W. S. Iljin.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität in Prag.)

(Eingegangen am 11. Dezember 1923.)

Die Versuche, welche der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, sind bereits in Rußland im Jahre 1920 in der Ekaterinoslawer landwirtschaftlichen Distriktsversuchsstation angestellt worden, konnten aber wegen der damals in Rußland herrschenden Verhältnisse nicht veröffentlicht werden. In meiner in dieser Zeitschrift 132, 1922, erschienenen Arbeit über die Wirkung der Salze beim Abbau der Stärke in den Pflanzen wies ich auf den Umstand hin, daß die Salze fähig wären, in vitro bei völligem Fehlen von Enzymen die Stärke zu hydrolysieren; der Abbau erfolgt auf demselben Wege wie bei Einwirkung des Enzyms, d. h. wir erhalten Dextrine, die violette und rote Jodreaktionen ergeben. An der Lösung dieses Problems arbeiten gegenwärtig *W. Biedermann* und *H. Haehn*, deren Arbeiten in dieser Zeitschrift 135, 1923, veröffentlicht worden sind.

Ersterer benutzte zu seinen Versuchen vorwiegend reine Salze, der zweite hauptsächlich Salzmischungen. Ich arbeitete ausschließlich mit reinen Salzen.

Für meine Experimente kam hauptsächlich reine, unverarbeitete Kartoffelstärke oder sogenanntes „Amylum solubile" von *Kahlbaum* zur Anwendung. In beiden Fällen wurden geringe Quanten Stärke abgewogen, mit Wasser verrührt, gekocht und filtriert. Für jeden Versuch wurde die Lösung frisch hergestellt.

Die Hydrolyse gelang nur in dem Falle, wenn die Konzentration der Stärkelösung eine geringe war. Daher wandte ich nur verdünnte Lösungen an, die eine rein blaue Färbung bei der Jodprobe ergaben. Die Stärkelösung wurde in gleichen Mengen in Reagenzgläser gefüllt, denen vorerst durchgekochte Salzlösung in verschiedener Konzentration zugesetzt wurde; dann wurde sorgfältig durchgemischt. Die Reagenzgläser wurden bei Zimmertemperatur, die in Südrußland ziemlich hoch ist, etwa 25^0, zuweilen auch darüber, belassen. Für die Jodprobe wurde ein bestimmtes Quantum der Lösung den Reagenz-

gläsern entnommen. Bei einigen Versuchen wurden die Proben periodisch entnommen.

Im ganzen wurden etwa 15 Versuchsreihen angestellt, von denen ich im folgenden einige, und zwar die charakteristischsten, anführen will.

In einem Falle wurde eine schwache Stärkelösung, die aber noch eine vollkommen deutliche Jodreaktion aufwies, genommen und ihr verschiedene Mengen NaCl zugesetzt. Im Laufe von 72 Stunden wurden fünfmal Proben entnommen. In Tabelle I sind die Intensitäten der Jodreaktion, die bei verschiedener Konzentration und zu verschiedener Zeit erhalten wurden, angeführt. Bei Abwesenheit von Chlornatrium blieb die Konzentration während der ganzen Zeit unverändert. Die Salze aber führten Lösung der Stärke herbei. Am energischsten wirkte die schwächste Lösung von m/500, bei wachsender Konzentration verlangsamte sich der Abbau und hörte bei hoher (m/60) vollkommen auf.

Tabelle I.

NaCl, normale Lösungen	Stärkegehalt				
	nach 12 Std.	nach 24 Std.	nach 36 Std.	nach 48 Std.	nach 72 Std.
0,0	viel	viel	viel	viel	viel
0,05	"	Spuren	kein	kein	kein
0,1	"	wenig	Spuren	"	"
0,2	"	viel	"	"	"
0,4	"	"	viel	wenig	wenig
0,6	"	"	"	viel	viel
1,0	"	"	"	"	"

In einem anderen Falle wurde eine Stärkelösung von verhältnismäßig hoher (0,5proz.) Konzentration genommen, die Hydrolyse nahm eine geraume Zeit in Anspruch. Die Reagenzgläser standen im Wasserbade bei 45° C. In der Tabelle II sind die Resultate der Jodreaktion zusammengestellt. Wir sehen, daß der Abbau der Stärke bei Einwirkung der Salze unter Bildung derselben Zwischenprodukte vor sich geht wie bei der Wirkung der Diastase und Säuren, d. h. wegen der Bildung von Dextrinen geht die blaue Färbung allmählich ins Violette und Rote über. Ein Überschuß des Salzes verlangsamte, ja brachte den Abbau auch bei diesem Versuch sogar zu völligem Stillstand.

Tabelle II.

NaCl, normale Lösungen	Jodreaktion		
	nach 24 Std.	nach 36 Std.	nach 68 Std.
0,0	blau	blau	blau
0,025	"	"	violett
0,05	blau-violett	violett	rot
0,1	blau	blau	"
0,2	"	"	violett
0,4	"	"	blau

Weiter wurden noch schwächere Lösungen von NaCl angewandt, und auch die Konzentration der Stärke von 0,02 bis 0,1 Proz. variiert (Tabelle III). Bei geringem Stärkegehalt konnte schon bei der ersten Probe nach 12 Stunden keine Stärke mehr nachgewiesen werden. Das Salz verhielt sich aktiv in überaus verdünnten Lösungen (m/50000), einige Hundertstel eines Mols hemmten schon den Abbau.

Tabelle III.

NaCl, normale Lösungen	Stärkegehalt anfangs Proz.	Stärkegehalt und Jodreaktion nach 12 Std.	Stärkegehalt und Jodreaktion nach 27 Std.	Stärkegehalt anfangs Proz.	Stärkegehalt und Jodreaktion nach 12 Std.	Stärkegehalt und Jodreaktion nach 27 Std.
0,0	0,02	viel (blau)	viel (blau)	0,05	viel (blau)	viel (blau)
0,0005	0,02	wenig (blau)	wenig (blau)	0,05	wenig	Spuren
0,001	0,02	kein	kein	0,05	viel (violett)	„
0,005	0,02	„	„	0,05	„ „	„
0,01	0,02	„	„	0,05	„ „	„
0,05	0,02	„	„	0,05	„ „	wenig
0,1	0,02	Spuren	Spuren	0,05	„ „	„
0,5	0,02	viel (violett)	„	0,05	„ „	„
0,0	0,03	viel (blau)	viel (blau)	0,1	viel (blau)	viel (blau)
0,0005	0,03	wenig	Spuren	0,1	viel (violett)	wenig
0,001	0,03	„	„	0,1	„ „	„
0,005	0,03	„	„	0,1	„ „	„
0,01	0,03	„	„	0,1	„ „	„
0,05	0,03	„	„	0,1	viel (blau)	viel (blau)
0,1	0,03	„	„	0,1	„ „	„ „
0,5	0,03	viel (violett)	„	0,1	„ „	„ „

Für Lithiumsalze konnten dieselben Eigenschaften, die Stärke zu hydrolysieren, wie für das Natrium festgestellt werden, wie es aus Tabelle IV ersichtlich ist, in der die Resultate der Versuche mit diesem Salze zusammengestellt sind.

Tabelle IV.

LiCl, normale Lösungen	Jodreaktion nach 4 Std.	Jodreaktion nach 8 Std.	Jodreaktion nach 22 Std.	Jodreaktion nach 34 Std.	Jodreaktion nach 56 Std.
0,0	blau	blau	blau	blau	blau
0,025	rot	kein	kein	kein	kein
0,05	blau	rot	„	„	„
0,1	„	violett	rot-violett	„	„
0,2	„	blau	violett	rot-violett	„
0,4	„	„	„	„	rot-violett

Stärkegehalt = 0,025 Proz. (anfangs).

Schon nach 4 Stunden war in einer schwachen LiCl-Lösung die Stärke fast vollkommen abgebaut. Konzentrierte Lösungen erwiesen sich auch für dieses Salz wenig oder gar nicht aktiv.

Aus Tabelle V ersehen wir, daß auch dem Calcium diese Fähigkeit eigen ist. Eine sehr schwache Lösung von m/10000 $CaCl_2$ zersetzte die Stärke nicht, m/50000 bis m/1000 erwiesen sich am aktivsten, in stark konzentrierten Lösungen blieb auch hier der Abbau der Stärke aus.

Tabelle V.

Stärkegehalt Proz. anfangs	$CaCl_2$ normale Lösungen	Stärkegehalt nach 34 Std.
0,01	0,0	viel
0,02	0,0	"
0,02	0,0001	"
0,02	0,0005	kein
0,02	0,001	"
0,02	0,005	Spuren
0,02	0,01	viel
0,02	0,05	"
0,02	0,1	"

Ähnliche Eigenschaften wurden auch für KCl, $MgCl_2$ und $BaCl_2$ nachgewiesen.

Beitrag zum Stickstoff- und Mineralstoffwechsel bei der Avitaminose.

Von

Nobumoto Hirabayashi (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 12. Dezember 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die besondere Beziehung der Vitamine und vor allem des Faktors A zu den Wachstumsphänomenen machen es verständlich, daß die Jugend durch eine vitaminarme Ernährung mehr gefährdet ist als das Alter. So lassen sich im Experiment auch gerade bei heranwachsenden Tieren die Avitaminoseerscheinungen besonders gut studieren; hier treten die Wachstumshemmung und jene der Rachitis ähnlichen Knochenveränderungen besonders anschaulich zutage. Der Körpergewichtssturz und die ganzen Veränderungen im Stickstoffstoffwechsel treten bei jungen Tieren, wie *Yoshiue* (1), anknüpfend an die Beobachtungen in Japan, daß jugendliche Personen leichter an Beriberi erkranken als alte, in unserem Laboratorium neuerdings feststellte, viel prompter auf als bei alten Tieren derselben Art.

Da nun bei älteren Tieren Stoffwechselversuche, die sich über die ganze Krankheitszeit bei vitaminfreier Ernährung erstrecken, kaum vorliegen — denn auch der Hund in dem *Tsuji*schen Versuch (2) war ein zwar ausgewachsenes, aber doch jüngeres Tier —, und da ferner dieser *Tsuji*sche Hund zudem gleichzeitig zellsalzarm ernährt worden war, habe ich bei einem älteren, ausgewachsenen Tiere einen derartigen Stoffwechselversuch gemacht unter Zulage aller Salze zur Nahrung und bei einer Fütterung mit einem etwas reichlicheren Kaloriengehalt der Nahrung, als er zur Erhaltung des Körpergewichtsgleichgewichts erforderlich gewesen wäre (84 Cal anstatt 64 Cal pro Kilogramm).

Um einen tieferen Einblick in alle möglichen Variationen zu erhalten, die sich bei der avitaminösen Stoffwechselstörung einstellen können, ist es überhaupt erforderlich, ein möglichst vielseitiges

kasuistisches Material beizubringen. Denn genau so wie die Avitaminose beim Menschen in verschiedenen klinischen Krankheitsbildern verläuft, ist es auch bei dem Tiere der Fall: bald herrschen die nervösen Erscheinungen, bald die kardialen, bald die ödematösen Erscheinungen, bald die Magen-Darmstörungen und die skorbutischen Symptome mehr vor, bald steht im Vordergrunde die allgemeine Ernährungsstörung und die Abnahme des Körpergewichtes.

Der Hund, über den ich in meiner vorliegenden Arbeit berichten will, zeigte im Krankheitsverlauf die Besonderheit, daß er bis zum 42. Tage der Krankheit keinen wesentlichen Körpergewichtsverlust erkennen ließ, daß er aber vom 43. Tage der vitaminfreien Ernährung an Erscheinungen seitens des Digestionstraktus aufwies, die in einer in Unterbrechungen auftretenden, partiellen Nahrungsverweigerung und gelegentlichem Erbrechen bestanden. Kurz vor dem Tode war das Erbrechen, und waren die Stühle stark blutig, und bei der Sektion nach dem am 102. Tage der vitaminfreien Ernährung spontan erfolgten Tode fanden sich Blutungen in der Magen- und Darmschleimhaut ohne nachweisbare Geschwürsbildungen. Es handelt sich also um einen Hund, der bis zum 42. Tage der vitaminfreien Ernährung quantitativ seine zugemessene Nahrung täglich auffraß, dann aber an gastrischen Erscheinungen, schließlich auch an Darmstörungen erkrankte, die sich als Folgen einer skorbutischen Affektion darstellten. Bei diesem Hunde war also in der Krankheitsperiode vom 42. Tage der avitaminösen Ernährung bis zum Tode die avitaminöse Störung kompliziert durch die Erscheinungen einfacher Inanition, die durch die in Intervallen auftretende Nahrungsverweigerung erzeugt wurde.

Wir müssen daher bei der Betrachtung des Stoffwechselversuches an diesem Tiere drei Perioden unterscheiden: 1. die Vorperiode, in der das Tier vitaminhaltiges Futter bekam, 2. die Hauptperiode, in der es vitaminfreies Futter erhielt, und diese Hauptperiode zerfällt wieder in zwei Abschnitte, nämlich einem Abschnitt 2a, die Zeit der reinen Avitaminose, in der das Tier seine Nahrung quantitativ auffraß und keinerlei gastrointestinale Störungen erkennen ließ, und einem Abschnitt 2b, die Zeit der skorbutischen Erkrankung, in der die gastro-intestinalen Störungen klinisch nachweisbar waren, und in der das Bild der Avitaminose durch echte Inanition zeitweise mehr oder weniger getrübt war.

Periode I.

In der Vorperiode (6 Tage) befand sich der Hund im Zustande einer leichten Körpergewichtszunahme (8100 bis 8200 g), und in einer schwach positiven N-Bilanz (durchschnittlicher Tageswert + 0,43 g). Vor dieser hier verzeichneten Vorperiode war der Hund bereits 14 Tage im Versuch, um ihn allmählich in den annähernden Gleichgewichtszustand durch die Regulierung der Nahrungszufuhr zu bringen. Der Hund wurde etwas überreich mit N gefüttert und hatte auch den hohen Wert von 84 Cal pro Kilo Körpergewicht in seiner Nahrung.

Periode IIa.

Mit Beginn der vitaminfreien Ernährung setzte eine sehr geringfügige Körpergewichtsabnahme ein, die bis zum 18. Tage der vitaminfreien Ernährung anhielt, aber im ganzen nur etwa 100 g betrug. Alsdann erfolgte eine deutliche Körpergewichtszunahme von etwa 350 g im ganzen, bis zum 42. Tage der vitaminfreien Ernährung. Nunmehr kam es mit den auftretenden gastrischen Erscheinungen zu einem rapiden Gewichtsabfall.

Während der geringfügigen Körpergewichtsabnahme in den ersten 18 Tagen der Avitaminose wurde die N-Bilanz mit einer vorübergehenden Unterbrechung stärker positiv und erreichte am 30. Tage mit + 2,70 g N pro Tag ihren höchsten Wert. Die in dieser Zeit der Avitaminose gewöhnlich langsam einschmelzenden Kohlehydrat- und Fettbestände des Körpers sind bei der abundanten Eiweißernährung dieses Tieres offenbar zum Teil durch Eiweiß ersetzt worden oder nicht in entsprechendem Umfange eingeschmolzen worden, oder ihr Verlust ist durch Eiweißansatz überkompensiert worden, worauf die Steigung der N-Retention und die Körpergewichtszunahme hinweisen. In den folgenden 6 Tagen ging diese positive N-Bilanz rapide zurück auf + 1,17 g N, obgleich das Körpergewicht noch weiter anstieg, dann senkte sich die N-Bilanz auf + 0,80 g bei unverändertem Körpergewicht. Erst jetzt wurde mit dem Eintritt der gastrischen Störungen die N-Bilanz bei sinkendem Körpergewicht negativ.

Es kündigte sich also die Verschlimmerung der avitaminösen Störung, nämlich die gastrischen Erscheinungen, schon vor dem Ausbruch dieser klinischen Symptome in einer brüsken Abnahme der positiven N-Bilanz an, ohne daß das Körpergewicht dadurch zunächst ungünstig beeinflußt wurde. Das ist natürlich nur möglich bei so reichlicher Ernährung, wie sie dieser Hund erhielt.

Periode IIb.

In diesem Abschnitt der avitaminösen Periode, der vom 43. Tage bis zum Tage des spontan erfolgenden Todes, nämlich zum 102. Tage reichte, geht der Verlauf der Gewichtskurve und der Kurve der Stickstoffbilanz konform mit dem Umfang der Störung bei der Nahrungsaufnahme. Trotz abfallenden Körpergewichtes kommen aber auch hier noch Zeiten einer stärkeren N-Retention vor; nach einer vorübergehenden besonders intensiven Verschlechterung der Nahrungsaufnahme mit stärkerem Gewichtsabfall kann mit der Besserung der Ernährung wohl auch eine vorübergehende Gewichtszunahme eintreten, aber während dieser oder bei einem Stillstand derselben kann doch die N-Bilanz wieder sich derNegativität nähern, und es kommt sogar in der Woche vor dem Tode des Tieres trotz stark abfallenden Körpergewichtes bei relativ guter Nahrungszufuhr zu einer starken Stickstoffretention, wie das auch *Tsuji* (2) in seinem Versuche gesehen hat.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß bei der mit echtem Hunger komplizierten Avitaminose der Verlauf der Stickstoffbilanzkurve außerordentlich unregelmäßig wird, daß diese Kurve aber weitgehend unabhängig von der Körpergewichtskurve verläuft, daß es insbesondere trotz sinkenden Körpergewichtes zu Stickstoffretentionen kommen kann.

Da nun auch der *Tsuji*sche Hund, der während der ganzen Zeit des Versuchs sein avitaminöses Futter quantitativ auffraß, und der progressiv ganz gleichmäßig an Körpergewicht abnahm, in der Zeit der stärksten Ausbildung der Avitaminose eine sehr beträchtliche N-Retention erkennen

ieß, nachdem vorher die N-Bilanz stark negativ geworden war, geht aus dieser Beobachtung wie auch aus der meinigen hervor, daß die N-Ausscheidungskurve keineswegs immer in direkter Beziehung zu den Veränderungen des Körpergewichtes steht, daß also die Körpergewichtsabnahme und auch die vorübergehenden Körpergewichtszunahmen bei der Avitaminose nicht immer notwendig auch ihren Ausdruck in der Größe der N-Ausscheidung finden müssen. Die Körpergewichtsabnahme wird ja neben dem Protoplasmaschwund vor allem noch durch den Fettschwund bestimmt, wie *Asada* (3) nachwies. Es braucht aber auch eine N-Retention bei der Avitaminose keineswegs eine Verminderung des Protoplasmazerfalls oder gar einen Eiweißansatz zu bedeuten. Es kann bei dieser Krankheit auch ohne diese beiden Phänomene zu einer Retention von Stickstoff im Blute kommen. In der Tat haben nun *Collazo* (4) an Hunden und Meerschweinchen und *Alpern* (5) an Tauben gefunden, daß der Reststickstoff des Blutes bei vitaminfrei ernährten Tieren mit gewissen Schwankungen im Verlauf der Krankheit ziemlich stark ansteigt und daß gerade bei Tauben mit diesem Anstieg des gesamten Reststickstoffs speziell auch eine Vermehrung des Aminosäurestickstoffs im Blute einhergeht. Es finden demnach bei der Avitaminose genau wie im Zustande des echten Hungers Störungen im intermediären N-Stoffwechsel statt, die darauf beruhen, daß das Blut nicht in normaler Weise von N-Schlacken befreit wird. Diese N-Retention im Blute muß sich aber auch in der gesamten N-Bilanz ausdrücken, es muß ein stärkerer Anstieg des Rest-N im Blute zu einer stärker positiven Gesamt-N-Bilanz führen. Darum zeigt bei der Avitaminose genau wie im Hunger die Gesamt-N-Bilanz nicht ohne weiteres die jeweils vorhandene Störung im zellulären Eiweißstoffwechsel an. Es kann sich bei der Avitaminose das Protoplasma genau wie im echten Hungerzustand fortschreitend zersetzen, ohne daß dieser Zersetzungsprozeß in einer progressiv dem Zersetzungsprozeß immer mehr negativ werdenden Gesamt-N-Bilanz zum Ausdruck kommt. Es kommt also bei der Avitaminose zu einer mit gelegentlichen Remissionen verbundenen progressiven Stauung von Reststickstoff im Blute. Diese Vermehrung des Reststickstoffs kann bei der Avitaminose genau wie beim Hunger von vermehrtem Zerfallsmaterial des Protoplasmas herrühren, aber außerdem auch bei der Avitaminose auf noch nicht assimiliertem Nahrungsstickstoff beruhen, wofern bei der Avitaminose die Regeneration der Aminosäuren der Nahrung zu Eiweiß in der Darmwand notleiden, oder die Aufnahme resorbierter Aminosäuren durch die Körperzellen verzögert sein sollte, was vielleicht möglich ist.

Da nun, wie ich schon sagte, diese Rest-N-Vermehrung im Blute ebensowohl bei der Avitaminose, wie auch beim echten Hunger vorkommt, müssen bei meinem Hunde in der Periode IIb diese beiden Ursachen (Hunger und Avitaminose) für die Rest-N-Vermehrung im Blute gleichsinnig zusammengewirkt haben.

Angesichts dieser Tatsachen muß man sich nun die Frage vorlegen, warum bei der Avitaminose und auch im Hungerzustande das Blut nicht von jenen Stickstoffverbindungen, die den Rest-N ausmachen und die beim Hunger nur Protoplasmazerfallsprodukte sein können, befreit wird. Entweder könnte eine pathologische Niereninsuffizienz vorliegen, oder diese Stickstoffverbindungen könnten keine harnfähigen Substanzen sein und die Bildung der harnfähigen Substanzen aus jenen Verbindungen könnte gestört sein. Diese Fragen bedürfen einer weiteren Untersuchung; eine Antwort läßt sich heute kaum geben.

Aus meinen Beobachtungen geht demnach in Verbindung mit den Befunden von *Alpern* und *Collazo* hervor, daß die Avitaminose in weitgehendem Maße gleichsinnig auf den gesamten N-Umsatz einwirkt, wie die echte Inanition infolge mangelhafter oder fehlender Nahrungsaufnahme.

Nach den Beobachtungen am Hunde und auch am Menschen (vgl. *v. Noorden*, Pathol. d. Stoffwechsels 1, 313, IIA) zeigt aber die Stickstoffausscheidung beim echten Hunger eine kontinuierliche abfallende Kurve. Nur in den ersten Tagen und dann kurz vor dem Tode ist die N-Ausscheidung stärker gesteigert als in der mittleren Periode, in der der Eiweißumsatz zwar fortschreitet, aber doch auf ein Minimum eingeschränkt wird, und die Kurve einen sehr gleichmäßigen, langsam sinkenden Verlauf hat. Bei der Avitaminose dagegen braucht die Stickstoffausscheidung keine kontinuierlich abfallende Linie zu sein, sondern zeigt gelegentlich und gerade in der prämortalen Periode Zacken nach der positiven Seite trotz fortschreitender Krankheit und Körpergewichtsabnahme.

Beim echten Hunger kann angesichts dieser Tatsachen die Rest-N-Stauung im Blute höchstens zu einer Verminderung der N-Ausscheidung durch den Harn bei fortschreitend negativer Bilanz führen. Da aber bei der Avitaminose die negative Bilanz in die positive umschlagen oder eine positive Bilanz stärker positiv werden kann, muß hier entweder die Rest-N-Stauung im Blute primär zeitweise hochgradig verstärkt werden können, oder es müssen sich vorübergehend akute Insuffizienzen in den Exkretionsorganen einstellen. In den ersten Stadien der Avitaminose kann es wohl auch noch zu Stickstoffansatz kommen, wie die Wachstumsbeobachtungen bei jungen Tieren und meine Beobachtungen es zeigen, aber es ist durchaus unwahrscheinlich, daß gerade im letzten Stadium der Avitaminose es auf einmal zeitweise wieder zu verstärktem Stickstoffansatz, also zur Eiweißmast kommen sollte.

Man muß also bei der Beurteilung der N-Bilanzkurve immer an die Möglichkeit denken, daß die Kurve nicht in jeder Phase die Größe der N-Zersetzung oder des N-Ansatzes unmittelbar zum Ausdruck bringt. Daß sie das im großen und ganzen und besonders auch in den ersten Stadien der Krankheit tut, wird natürlich darum nicht bestritten.

Zusammenfassung.

1. Im Beginn der Avitaminose kann beim älteren Hunde und bei reichlicher Ernährung das Körpergewicht mehrere Wochen bei kleinen Schwankungen auf normaler Höhe bleiben oder sogar etwas zunehmen bei zunehmender N-Retention.

Trotz ansteigenden Körpergewichtes kann aber die Stickstoffausscheidung in dieser Zeit auch schon zuzunehmen beginnen.

2. Treten im weiteren Verlauf der Avitaminose Symptome einer Störung der Magen-Darmfunktion auf, so verbinden sich die Avitaminoseerscheinungen mit den Erscheinungen echten Hungers. Diese sekundäre avitaminöse Erkrankung des Magen-Darmtraktus beherrscht dann in erster Linie den Verlauf des Körpergewichtes und der Stickstoffausscheidung.

3. Gegen Ende der Krankheit kann sich bei der Avitaminose, einerlei, ob sie mit mangelhafter Nahrungsaufnahme verbunden ist

oder nicht, bei sinkendem Körpergewicht vorübergehende Stickstoffretention einstellen.

4. Die Stickstoffausscheidungskurve zeigt bei der Avitaminose nicht immer unmittelbar die Größe der Stickstoffzersetzung im Körper an, da der Reststickstoff des Blutes sich progressiv bei dieser Krankheit vermehrt, und da außerdem eine Insuffizienz in der Ausscheidung des umgesetzten Stickstoffs auftreten kann.

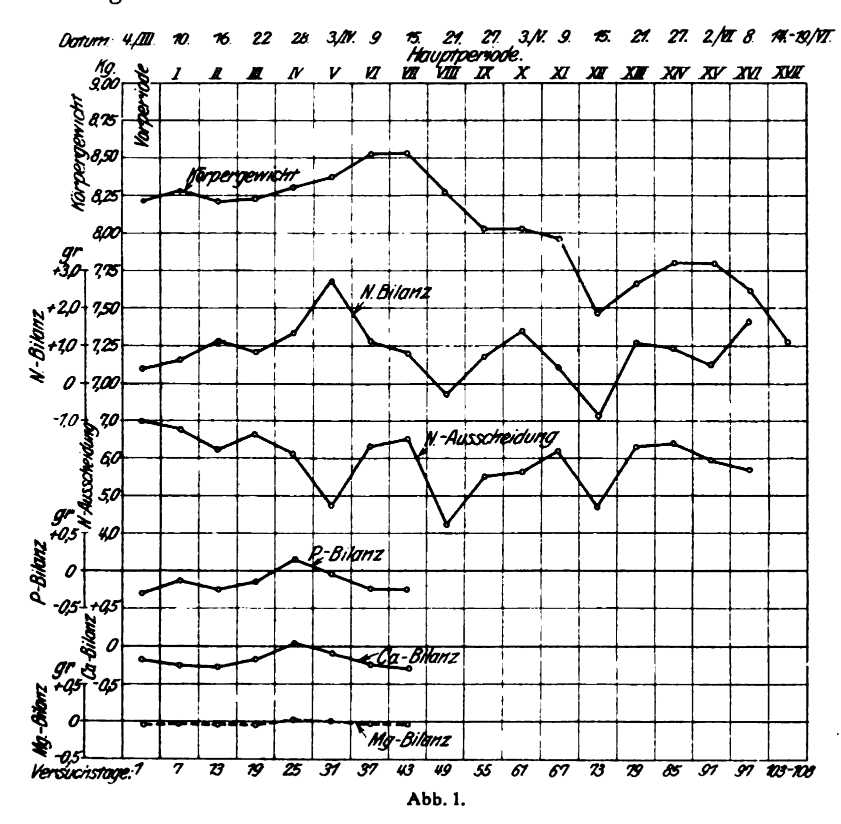


Abb. 1.

Ich habe nun ferner bei diesem Hunde den Mineralstoffwechsel in der Periode untersucht, in der Magen-Darmstörungen noch nicht vorhanden waren. In der späten Periode habe ich nur gelegentlich die Mineralstoffausscheidung bestimmt. Meine Beobachtungen erstrecken sich auf das Calcium, Magnesium und den Phosphor.

Phosphorstoffwechsel.

Nach den Beobachtungen von *Morinaka* (6) und *Yoshiue* (7) ändert sich der Phosphorgehalt des Körpers bei der Avitaminose in erster Linie konform mit dem Weichteilschwunde, da das Skelett im Vergleich zu den

Weichteilen geringfügigere Einbußen erleidet. Da der Weichteilphoshor vor allem wieder im Zelleiweiß sitzt, muß also sein Schwund an den Schwund des Eiweißes und nicht an denjenigen der Fette und Kohlehydrate gebunden sein. Dabei wird jedoch das Zelleiweiß nicht prozentig phosphorärmer, sondern es nimmt nur der gesamte Phosphorgehalt des Körpers in erster Linie entsprechend dem Eiweißbestande ab. Es kann also der avitaminöse Körper nur dann größere Mengen Phosphor ausscheiden, wenn er auch Zelleiweiß in größerem Umfange zersetzt. Mit anderen Worten: je geringer die N-Zersetzung, um so geringer muß die P-Ausscheidung sein.

Lawaczek (8) hat nun gefunden, daß der Gesamtphosphorgehalt der Skelettmuskulatur und des Herzens bei der Tauben-Beriberi auf das frische, bei der Avitaminose etwas wasserreichere Organ berechnet, vermindert ist, auf die Trockensubstanz bezogen, aber normal ist. Über den Gesamtphosphorgehalt des Blutes bei der Avitaminose liegen keine Beobachtungen vor. Die *Lawaczek*sche Feststellung stimmt also mit den Ergebnissen von *Morinaka* und *Yoshiue* überein.

Da nun, wie ich oben ausführte, bei der Avitaminose die Größe der N-Zersetzung nicht ohne weiteres in der Größe der N-Ausscheidung durch den Harn zur Anschauung zu kommen braucht, indem angesichts der Blutreststickstoffvermehrung hier N-Retentionen ohne gleichzeitigen N-Ansatz möglich sind, braucht auch die Kurve der N-Ausscheidung im Harn nicht mit der Kurve der P-Ausscheidung durch den Harn ganz streng parallel zu gehen.

An meinem Hunde sehen wir jedoch, daß in den ersten 42 Tagen der vitaminfreien Fütterung in den Perioden am wenigsten P ausgeschieden wird, in denen die N-Retention am größten ist. Kleinere Schwankungen in der N-Retention gehen dagegen nicht immer parallel mit entsprechenden Schwankungen in der P-Kurve. Im Durchschnitt aber ist in dieser ganzen Zeit, in der es ja auch zur Körpergewichtszunahme kommt, die Ausscheidung im Harn und Kot kleiner als in der Vorperiode bei normaler Ernährung.

Nach alledem besteht also in diesen ersten Wochen der Avitaminose doch ein ungefährer Parallelismus zwischen der Größe der N- und der Größe der P-Ausscheidung, woraus geschlossen werden darf, daß zwischen der Stickstoff- und Phosphorumsetzung auch ein inneres Abhängigkeitsverhältnis vorhanden ist.

Kalk- und Magnesiumstoffwechsel.

Die Kalk- und Magnesiumbilanzkurven verlaufen im großen und ganzen unter sich parallel, d. h. in der Periode, in der die Kalkbilanz positiv wird, geschieht gleiches bei der Magnesiumkurve. Kleine Divergenzen sind natürlich an verschiedenen Stellen vorhanden. Im Durchschnitt ist in der Periode IIa, also in der Anfangsperiode der Avitaminose die Kalkausscheidung kaum merklich gesteigert, fast unverändert wie in der Vorperiode, die Magnesiumausscheidung nimmt sogar etwas ab.

Wenn man nun die Kalk- und Magnesiumausscheidung mit der N-Ausscheidung in Beziehung setzt, dann findet man, daß mit der starken N-Retention zwischen dem 18. und 36. Versuchstage auch die Kalk- und Magnesiumausscheidung vorübergehend wesentlich abnehmen.

Wenn wir nun den gesamten Mineralstoffwechsel bei diesem Hunde in der Vorperiode und in der ersten Zeit der avitaminösen

Fütterung überblicken, so stellen wir fest, daß sich das Tier schon in der Vorperiode in einer negativen P-, Ca- und Mg-Bilanz befand. In der ersten Zeit der vitaminfreien Periode werden alle diese Bilanzen mit dem zunehmenden Körpergewicht und der zunehmenden N-Retention weniger stark negativ und schließlich schwach positiv. Kurz bevor aber die N-Ausscheidung nunmehr im weiteren Verlauf der Krankheit ansteigt und erst recht während der stark erhöhten Stickstoffabgabe werden die P-, Ca- und Mg-Bilanzen in ziemlich brüsker Weise stark negativ. Dann kommt die Periode, in der die gastrointestinale Erkrankung das Bild der reinen Avitaminose durch echte Inanitionserscheinungen trübt. Es lehrt also dieser ganze Versuch für den Mineralstoffwechsel bei der Avitaminose, daß die Ausscheidung von P, Ca und Mg im großen und ganzen parallel geht mit der Intensität der avitaminösen Störung im Eiweißstoffwechsel. Je weniger Protoplasma zerfällt, je geringer die N-Ausscheidung ist, um so besser wahrt auch der Körper seinen Mineralstoffbestand. In früheren Arbeiten aus dem hiesigen Laboratorium haben *Miyadera* (9), *Yoshiue* (10) und *Haramaki* (11) gezeigt, daß der avitaminöse Körper Kalk und Eisen schlechter ansetzt als ein mit Vitamin ernährter Organismus. Mein Versuch zeigt, daß mit der Änderung des Eiweißstoffwechsels auch die Mineralstoffausscheidung sich bei der Avitaminose ändert. Es wird also letzten Endes auch jede Störung des Mineralstoffwechsels bei der Avitaminose nur eine Begleiterscheinung oder, genauer gesagt, eine Folgeerscheinung der Störung im Stoffwechsel der organischen Substanz, speziell des Protoplasmas sein.

Experimenteller Teil.

Futter der Vorperiode.

	pro Tag
Weizeneiweiß[1]	45 g
Reis, poliert und gewaschen	70 g
Butter	20 g
Frische Hefe	2 g
Salzgemisch	2,7 g
Aqua dest.	900 ccm

Futter der Hauptperiode.

	pro Tag
Weizeneiweiß, autoklavisiert bei 135° 3 Std.	46 g
Reis, poliert und gewaschen	70 g
Schweineschmalz, ausgelassen	20 g
Salzgemisch	2,7 g
Aqua dest.	900 ccm

Reis und Weizeneiweiß wurden mit Wasser gekocht, dann wurden die übrigen Bestandteile des Futters nach dem Erkalten zugesetzt.

[1]) Das Weizeneiweiß wurde von der chemischen Fabrik Dr. Klopfer in Dresden-Leubnitz bezogen.

Zusammensetzung des Salzgemisches.

Kochsalz	250 g
Calc. phosphoricum	100 g
Mag. citricum	100 g
KCl	15 g
Ferr. citricum	30 g
Jod. pur.	0,95 g
Kali jodat.	0,1 g

Nahrungsanalyse.

Vorperiode. Tagesration.

45 g Weizeneiweiß	6,3720 g N
70 g Reis	0,9443 g N
2 g Hefe	0,1669 g N
20 g Butter	—
2,7 g Salzgemisch	—
900 ccm Aqua dest.	—
Summe	7,4832 g N

Salzanalyse:

(Berechnung auf die sechstägige Futtermenge und auf das Atom.)

	Mg g	Ca g	P_2O_5 g
270 g Weizeneiweiß	0,0261	0,0292	0,4104
420 g Reis	0,0963	0,0330	0,7728
120 g Butter	0,0036	0,3156	0,8472
12 g Hefe	0,0134	0,0117	0,0282
16,2 g Salzgemisch	0,3363	0,7535	1,3374
Summe	0,4757	1,1430	3,3960

Hauptperiode. Tagesration.

46 g Weizeneiweiß	6,5136 g N
70 g Reis	0,9443 g N
20 g Schweineschmalz	—
2,7 g Salzgemisch	—
900 ccm Aqua dest.	—
Summe	7,4579 g N

Salzanalyse:

(Berechnung auf die sechstägige Futtermenge und auf das Atom.)

	Mg g	Ca g	P_2O_5 g
276 g Weizeneiweiß	0,0268	0,0296	0,4194
420 g Reis	0,0963	0.0330	0,7728
120 g Schweineschmalz	0,0036	0,3156	0,8472
16,2 g Salzgemisch	0,3364	0,7535	1,3374
Summe	0,4631	1,1318	3,3768

Harn und Kot wurden in sechstägigen Perioden gesammelt und analysiert. Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt.

Die Bestimmung von Calcium und Magnesium im Harn wurde nach der Vorschrift durchgeführt, die in *Neuberg* (12), „Der Harn", steht, und zwar wurde dabei Ca als CaO und Mg als Magnesiumpyrophosphat gravimetrisch bestimmt. Die Phosphorsäure im Harn wurde direkt mit Uran titrimetrisch bestimmt.

Zur Bestimmung des Ca, Mg und der Phosphate (*Thierfelder*) (13) wurde der Kot trocken verascht, die Asche mit Salzsäure extrahiert. Die Phosphate wurden nach *Neumann* (durch Fällung mit Ammonmolybdat) bestimmt, das Ca nach Fällung mit Ammonoxalat als CaO und das Magnesium als Pyrophosphat.

Schlußbetrachtung.

Die Beobachtung, die ich an meinem Hunde machte und die besagt, daß bei einem etwa 8 kg schweren ausgewachsenen Hunde 42 Tage vitaminfreier Ernährung vergehen können, ohne daß das Tier eine Einbuße an Körpergewicht erleidet, ja sogar eine Zunahme an Körpergewicht zeigt, und daß erst mit dem Eintritt von Störungen in der Magen-Darmfunktion und der konsekutiven Störung in der Aufnahme der Nahrung der Körpergewichtsabfall einsetzt, stellt aufs neue die Frage zur Diskussion, ob die Körpergewichtsabnahme überhaupt ein primäres avitaminöses Symptom ist, d. h. bedingt ist durch die Störung des zellulären Stoffwechsels aller Körperzellen, oder ob sie in dem Sinne ein sekundäres avitaminöses Symptom darstellt, daß durch eine primäre avitaminöse Störung der Darmepithelien die Resorption herabgesetzt wird, was dann zur Folge hätte, daß sich die Erscheinungen einer einfachen Inanition einstellen und sich dem primär-avitaminösen Symptomenkomplex beimischen. Ferner wirft mein Versuch aufs neue die Frage auf, in welchem Umfange nun bei der Avitaminose überhaupt der Stoffwechsel der organischen Substanz primär eine Störung erleidet und wie diese Störung gegen diejenigen Störungen abgegrenzt ist, die die organische Substanz durch die einfache Inanition erfährt. Es sind zunächst Versuche erforderlich, die uns einen noch genaueren Aufschluß über die Darmresorption während der Avitaminose geben, und zwar dann, wenn klinische Erscheinungen einer Resorptionsstörung fehlen und wenn auch aus dem N-Gehalt des Kotes sich keine Resorptionsstörung ergibt, wie das bei dem *Tsuji*schen Hunde der Fall war.

Literatur.

1) *Yoshiue*, nach dem Manuskript. — 2) *Tsuji*, diese Zeitschr. **129**. Über den Stoffwechsel bei vitaminfreier Ernährung. — 3) *Asada*, diese Zeitschr. **141**, 1923. — 4) *Collazo*, nach 5) zitiert. — 5) *Alpern*, diese Zeitschr. **138**, 1923. — 6) *Morinaka*, ebendaselbst **117** u. **142**. — 7) *Yoshiue*, ebendaselbst **134**. — 8) *Lawaczek*, Hoppe-Seyler **125**, 1923. — 9) *Miyadera*, diese Zeitschr. **130**. — 10) *Yoshiue*, ebendaselbst **134**. — 11) *Haranaki*, ebendaselbst **134**. — 12) *Neuberg*, Der Harn, I. Teil, S. 166. — 13) *Thierfelder*, Lehrb. d. physiol.-pathol.-chemischen Analyse, 8. Aufl.

Tabelle 1.

Periode	Nummer des Versuchstages	Körpergewicht	Körpergewicht durchschnittlich	Tägliche Harnmenge	Gesamt-N im Harn, pro Tag durchschnittlich	Kotmenge in einer Periode, getrocknet	Kot N in einer Periode, pro Tag durchschnittlich	Gesamt-N im Harn und Kot, pro Tag	Nahrungs-N, pro Tag	Tägliche N-Bilanz	Bemerkungen
						Vorperiode.					
	4. III. 1922										
	1	8100	—	340	—	—	—	—	—	—	
	2	8200	—	545	—	—	—	—	—	—	
	3	8200	—	270	—	—	—	—	—	—	
	4	8300	—	370	—	—	—	—	—	—	
	5	8300	—	305	—	—	—	—	—	—	
	6	8200	8217	480	6,7962	35,85	0,2582	7,0544	7,4832	+ 0,4288	
						Hauptperiode.					
I	7	8256	—	340	—	—	—	—	—	—	
	8	8300	—	510	—	—	—	—	—	—	
	9	8450	—	420	—	—	—	—	—	—	
	10	8300	—	320	—	—	—	—	—	—	
	11	8200	—	360	—	—	—	—	—	—	
	12	8200	8283	545	6,4801	40,08	0,3259	6,8060	7,4579	+ 0,6519	
II	13	8200	—	145	—	—	—	—	—	—	
	14	8200	—	415	—	—	—	—	—	—	
	15	8200	—	195	—	—	—	—	—	—	
	16	8250	—	390	—	—	—	—	—	—	
	17	8270	—	580	—	—	—	—	—	—	
	18	8210	8221	220	5,9529	44,09	0,3348	6,2877	7,4579	+ 1,1702	
	22. III. 1922										
III	19	8200	—	320	—	—	—	—	—	—	
	20	8270	—	465	—	—	—	—	—	—	
	21	8220	—	625	—	—	—	—	—	—	
	22	8250	—	455	—	—	—	—	—	—	
	23	8200	—	515	—	—	—	—	—	—	
	24	8220	8227	460	6,1530	45,50	0,4694	6,6224	7,4579	+ 0,8354	
IV	25	8220	—	200	—	—	—	—	—	—	
	26	8450	—	580	—	—	—	—	—	—	
	27	8250	—	270	—	—	—	—	—	—	
	28	8400	—	245	—	—	—	—	—	—	
	29	8200	—	580	—	—	—	—	—	—	
	30	8290	8301	588	5,9693	16,25	0,1552	6,1245	7,4579	+ 1,3334	
V	31	8320	—	518	—	—	—	—	—	—	
	32	8320	—	628	—	—	—	—	—	—	
	33	8350	—	390	—	—	—	—	—	—	
	34	8390	—	504	—	—	—	—	—	—	
	35	8350	—	400	—	—	—	—	—	—	
	36	8420	8358	320	4,4242	37,49	0,3310	4.7552	7,4579	+ 2,7027	
	9. IV. 1922										
VI	37	8500	—	685	—	—	—	—	—	—	
	38	8450	—	350	—	—	—	—	—	—	
	39	8500	—	400	—	—	—	—	—	—	
	40	8520	—	380	—	—	—	—	—	—	
	41	8550	—	265	—	—	—	—	—	—	
	42	8620	8523	447	5,9023	44,49	0,3808	6.2831	7,4579	+ 1,1748	

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Nummer des Versuchstages	Körpergewicht	Körpergewicht durchschnittlich	Tägliche Harnmenge	Gesamt-N im Harn, pro Tag durchschnittlich	Kotmenge in einer Periode, getrocknet	Kot-N in einer Periode, pro Tag durchschnittlich	Gesamt-N im Harn und Kot, pro Tag	Nahrungs-N, pro Tag	Tägliche N-Bilanz	Bemerkungen
					Hauptperiode.					
9. IV. 1922										
VII 43	8200	—	470	—	—	—	—	—	—	
44	8620	—	793	—	—	—	—	—	—	
45	8640	—	750	—	—	—	—	—	—	
46	8570	—	550	—	—	—	—	—	—	
47	8620	—	530	—	—	—	—	—	—	
48	8570	8537	553	5,9752	60,84	0,6216	6,5968	7,4579	+ 0,8611	
VIII 49	8670	—	200	—	—	—	—	—	—	Sehr schlecht gefressen.
50	8340	—	120	—	—	—	—	—	—	
51	8180	—	175	—	—	—	—	—	—	
52	8200	—	70	—	—	—	—	—	—	
53	7850	—	110	—	—	—	—	—	—	
54	8400	8273	490	3,9752	27,80	0,2528	4,2280	3,8798	— 0,3482	
27. IV. 1922										
IX 55	8250	—	135	—	—	—	—	—	—	Schlecht gefressen.
56	8000	—	300	—	—	—	—	—	—	
57	8020	—	480	—	—	—	—	—	—	
58	7960	—	337	—	—	—	—	—	—	
59	8060	—	548	—	—	—	—	—	—	
60	8100	8065	445	5,3431	18,06	0,1595	5,5026	6,2149	+ 0,7123	
X 61	8050	—	410	—	—	—	—	—	—	Schlecht gefressen.
62	8000	—	610	—	—	—	—	—	—	
63	8020	—	430	—	—	—	—	—	—	
64	8000	—	330	—	—	—	—	—	—	
65	8050	—	475	—	—	—	—	—	—	
66	8070	8031	220	5,3592	32,33	0,3150	5,6742	7,1085	+ 1,4343	
XI 67	8100	—	265	—	—	—	—	—	—	Schlecht gefressen.
68	8100	—	500	—	—	—	—	—	—	
69	7970	—	505	—	—	—	—	—	—	
70	7870	—	515	—	—	—	—	—	—	
71	7920	—	450	—	—	—	—	—	—	
72	7900	7977	220	5,8618	33,92	0,3673	6,2291	6,6322	+ 0,4031	
15. V. 1922										
XII 73	7720	—	10	—	—	—	—	—	—	Sehr schlecht gefressen. Oft erbrochen.
74	7570	—	150	—	—	—	—	—	—	
75	7300	—	50	—	—	—	—	—	—	
76	7120	—	100	—	—	—	—	—	—	
77	7450	—	355	—	—	—	—	—	—	
78	7700	7477	460	4,5936	12,74	0,1113	4,7049	3,7289	— 0,9760	
XIII 79	7620	—	428	—	—	—	—	—	—	
80	7640	—	517	—	—	—	—	—	—	
81	7590	—	380	—	—	—	—	—	—	
82	7600	—	358	—	—	—	—	—	—	
83	7740	—	424	—	—	—	—	—	—	
84	7800	7665	517	5,9922	37,56	0,3371	6,3293	7,4579	+ 1,1287	

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Periode	Nummer des Versuchstages	Körpergewicht	Körpergewicht durchschnittlich	Tägliche Harnmenge	Gesamt-N im Harn, pro Tag durchschnittlich	Kotmenge in einer Periode, getrocknet	Kot-N in einer Periode, pro Tag durchschnittlich	Gesamt-N im Harn und Kot, pro Tag	Nahrungs-N, pro Tag	Tägliche N-Bilanz	Bemerkungen
					Hauptperiode.						
15. V. 1922											
XIV	85	7800	—	530	—	—	—	—	—	—	
	86	7740	—	530	—	—	—	—	—	—	
	87	7800	—	350	—	—	—	—	—	—	
	88	7850	—	630	—	—	—	—	—	—	
	89	7790	—	360	—	—	—	—	—	—	
	90	7820	7800	537	5,9157	51,86	0,5514	6,4671	7,4579	+ 0,9908	
21. VI. 1922											
XV	91	7720	—	582	—	—	—	—	—	—	
	92	7800	—	230	—	—	—	—	—	—	
	93	7720	—	630	—	—	—	—	—	—	Schlecht gefressen.
	94	7770	—	565	—	—	—	—	—	—	
	95	7990	—	460	—	—	—	—	—	—	Oft erbrochen.
	96	7820	7803	335	5,4337	46,92	0,5373	5,9710	6,4684	+ 0,4974	
XVI	97	7660	—	390	—	—	—	—	—	—	
	98	7700	—	450	—	—	—	—	—	—	
	99	7720	—	60	—	—	—	—	—	—	
	100	7420	—	545	—	—	—	—	—	—	
	101	7840	—	270	—	—	—	—	—	—	
	102	7440	7630	700	5,3968	31,46	0,3617	5,7585	7,3611	+ 1,6026	
XVII	103	7800	—	280	—	—	—	—	—	—	
	104	7440	—	275	—	—	—	—	—	—	Blutiges Erbrechen.
	105	7620	—	400	—	—	—	—	—	—	
	106	7310	—	120	—	—	—	—	—	—	Blutig. Kot.
	107	6900	—	—	—	—	—	—	—	—	
19. VI. 1922											
XVII	108	6560	7271	—	—	—	—	—	—	—	Gestorben.

Tabelle II.

Phosphorstoffwechsel als P_2O_5 in g.

	Im Harn	Im Kot	Summe	Im Futter	Bilanz pro Periode	Bilanz pro Tag
			Vorperiode.			
	2,3214	2,8277	5,1491	3,3960	— 1,7531	— 0,2922
			Hauptperiode.			
I	1,7850	2,5239	4,3089	3,3768	— 0,9321	— 0,1553
II	1,7900	3,1569	4,9469	3,3768	— 1,5701	— 0,2617
III	1,6575	2,7312	4,3887	3,3768	— 1,0119	— 0,1686
IV	1,4322	1,0565	2,4887	3,3768	+ 0,8881	+ 0,1480
V	1,3544	2,4327	3,7871	3,3768	— 0,4103	— 0,0684
VI	1,1700	3,7413	4,9113	3,3768	— 1,5345	— 0,2557
VII	1,5871	3,3438	4,9309	3,3768	— 1,5541	— 0,2590

Tabelle III.

Calciumstoffwechsel. Calcium als Atom in g.

	Im Harn	Im Kot	Summe	Im Futter	Bilanz pro Periode	Bilanz pro Tag
			Vorperiode.			
	0,3401	1,893	2,2339	1,1430	— 1,0909	— 0,1818
			Hauptperiode.			
I	0,3406	2,285	2,6256	1,1318	— 1,4938	— 0,2489
II	0,3443	2,385	2,7293	1,1318	— 1,5975	— 0,2662
III	0,3314	1,920	2,2514	1,1318	— 1,1196	— 0,1866
IV	0,2491	0,739	0,9881	1,1318	+ 0,1437	+ 0,0239
V	0,2304	1,585	1,8151	1,1318	— 0,6833	— 0,1139
VI	0,2543	2,362	2,6163	1,1318	— 1,4845	— 0,2474
VII	0,2744	2,534	2,8084	1,1318	— 1,6766	— 0,2794

Tabelle IV.

Magnesiumstoffwechsel. Magnesium als Atom in g.

	Im Harn	Im Kot	Summe	Im Futter	Bilanz pro Periode	Bilanz pro Tag
			Vorperiode.			
	0,2050	0,5161	0,7211	0,4757	— 0,2454	— 0,0409
			Hauptperiode.			
I	0,1378	0,5235	0,6613	0,4631	— 0,1982	— 0,0330
II	0,1985	0,6132	0,8117	0,4631	— 0,3486	— 0,0581
III	0,1758	0,6246	0,8004	0,4631	— 0,3373	— 0,0562
IV	0,1161	0,1782	0,2943	0,4631	+ 0,1688	+ 0,0281
V	0,0427	0,4175	0,4602	0,4631	+ 0,0029	+ 0,0005
VI	0,2324	0,5438	0,7762	0,4631	— 0,3131	— 0,0522
VII	0,0563	0,6096	0,6659	0,4631	— 0,2028	— 0,0338

Bestimmung der Hippursäure im Harn.

Von

I. Snapper und **E. Laqueur.**

(Aus dem Laboratorium des Instituts für allgemeine Pathologie der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 13. Dezember 1923.)

Die Hippursäure ist eine Substanz, welche bereits seit mehreren Jahren die physiologischen Chemiker und Pathologen erheblich interessiert. Der Grund dieses starken Interesses ist die Tatsache, daß die Hippursäure eine Kombination von Glykokoll und Benzoesäure ist und durch die Vermittlung der Hippursäure das Glykokoll, eine der wichtigsten Aminosäuren, den Organismus verläßt. Man weiß seit langem, daß man durch Eingabe von Benzoesäure die Menge der Hippursäure im Urin bedeutend vergrößern kann. Die Frage, wo bilden sich und wo kommen die großen Mengen Glykokoll her, nötig zur Synthese mit der Benzoesäure, ist für den physiologischen Chemiker ein sehr wichtiges und bis zu diesem Augenblick auch noch nicht gelöstes Problem.

Die Bedeutung der Hippursäure für den Pathologen beruht auf der Tatsache, daß beim Hunde nach den klassischen Untersuchungen von *Bunge* und *Schmiedeberg* (1) die Vereinigung der Benzoesäure mit Glykokoll *in* der Niere stattfindet. Keine der anderen Substanzen des Harns bildet sich, insoweit bekannt, in der Niere: sie entstehen in den verschiedenen Körperorganen und werden vom Blute zu den Nieren gebracht, um ausgeschieden zu werden. Deshalb beschränkt sich in fast allen Fällen die Tätigkeit der Nieren auf eine Konzentrierung der im Blute vorkommenden Substanzen. Die einzige Synthese, die wirklich in der Niere stattfände, wäre gerade die Bildung der Hippursäure. Es steht fest, daß diese Hippursäuresynthese bei den verschiedenen Tieren verschieden abläuft (2). Jedenfalls begreift man, daß zahlreiche Untersuchungen über die *Ausscheidung* der Hippursäure beim Menschen gemacht wurden, besonders im Hinblick auf die Synthese dieser Säure und ihrer Ausscheidung bei *Nierenkrankheiten.*

Um diese Untersuchungen wiederholen zu können, bedurften wir einer nicht zu schwierigen Methode, die eine quantitative Bestimmung der Hippursäure gestattet. Eine große Anzahl solcher Methoden ist bekannt (3). Man kann sie in drei Gruppen einteilen:

1. Man läßt die Hippursäure aus dem Harn auskristallisieren und wiegt die kristallisierte und gereinigte Säure.

Man zersetzt die Säure und 2. bestimmt die Menge des frei gewordenen Glykokolls oder 3. die Menge der freien Benzoesäure.

Zu 1. Bei der Kristallisation und dem Wiegen der Hippursäure stößt man immer auf viele zeitraubende Schwierigkeiten, die Reihenversuche fast unmöglich machen.

Zu 2. Die Bestimmung des Glykokolls aus der Hippursäure durch Titrieren mit Formol nach *Sörensen* ist im Falle des *normalen* Urins fast unmöglich, weil die frei gewordenen Mengen Glykokoll meist zu klein sind, wenn nicht der Urin eine außerordentlich große Menge von Hippursäure enthält. Die gasometrische Methode von *van Slyke* wäre demgegenüber vorzuziehen, aber sie verlangt wieder den Gebrauch eines komplizierten und zerbrechlichen Apparates.

Zu 3. Die Bestimmung der Benzoesäure kann zwar mit größter Genauigkeit gemacht werden, aber sie ist verwickelt.

Nach langen Versuchen sind wir bei Methoden geblieben, welche die Hippursäure isolieren, haben jedoch die Komplikationen der Reinigung und der Kristallisation dieser Substanz vermieden, indem wir nur den Stickstoff der erhaltenen Hippursäure bestimmten.

Diese Methode, zuerst von *Salkowski* mitgeteilt, später durch *Blumenthal* (4) vervollkommnet, ist von der Kritik nicht verschont geblieben (5). Tatsächlich ist der Gehalt der Hippursäure an Stickstoff so niedrig (7,83 Proz.), daß selbst geringe Verunreinigungen in Form von anderen stickstoffhaltigen Substanzen, im besonderen Beimengungen von Harnstoff, große Irrtümer bei der Berechnung der Hippursäure verursachen.

Um Hippursäure aus dem Urin zu erhalten, gibt es kaum ein anderes Mittel, als mit Essigäther zu extrahieren: im Essigäther ist die Hippursäure gut löslich. Indessen bleibt noch eine große Schwierigkeit, auf die *Salkowski* schon vor einer Reihe von Jahren hingewiesen hat; auch der Harnstoff löst sich in dieser Flüssigkeit. Daher hat auch *Blumenthal* in seiner Methode der Hippursäurebestimmung nicht den Essigäther als Extraktionsflüssigkeit benutzt, sondern eine Mischung von 20proz. Äther und Alkohol. Hier ist wieder der Nachteil, daß diese Alkohol-Äthermischung die Hippursäure nicht sehr gut aus dem Urin herausnimmt, so daß wir wieder auf das alte Mittel, den Essigäther, zurückgekommen sind.

50 ccm Harn, zu dem 0,3 ccm starke (38proz.) Salzsäure zugesetzt ist — in Gegensatz zur Hippursäure selbst sind die Salze dieser Säure nicht in Essigäther löslich —, werden eine Minute lang mit 50 ccm Essigäther geschüttelt; wiederholt man dies sechsmal, indem man jedesmal frische Lösung nimmt, so ist sämtliche Hippursäure aus dem Urin extrahiert und in den Essigäther übergegangen. Zugleich enthalten die 300 ccm Lösung außer der Hippursäure eine erhebliche und wechselnde Menge Harnstoff. In unseren Versuchen schwankte diese gleichzeitig mit der Hippursäure extrahierte Menge Harnstoff zwischen 60 und 120 mg. Es ist klar, daß diese Menge Harnstoff gänzlich oder fast ganz entfernt werden muß, ehe man an eine Bestimmung der Hippursäure denken kann. Zu diesem Zwecke behandeln die Untersucher den Essigäther mit destilliertem Wasser; dieses Auswaschen des Essigäthers hat zwei Unannehmlichkeiten:

1. Wird nicht aller Harnstoff entfernt: löst man 90 mg Harnstoff in 50 ccm Essigäther, so verbleibt in dieser Lösung nach einer Minute Schüttelns mit 50 ccm Wasser 6 bis 9 mg Harnstoff.

2. Eine ziemlich bedeutende Menge Hippursäure geht aus dem Essigäther ins Wasser über: löst man eine bestimmte Menge dieser Säure in 50 ccm Essigäther auf und schüttelt eine Minute mit 50 ccm Wasser, so gehen 35 bis 40 Proz. der Hippursäure in das Spülwasser über, wie die folgende Tabelle zeigt:

Hippursäure mg	Essigäther ccm	Geschüttelt Minuten	Aqua dest. ccm	Verlust Proz.
40	50	1	50	41
100	50	1	50	38
200	50	1	50	36
500	50	1	50	34

Wir haben den Essigäther mit verschiedenen Mengen Wasser und während verschiedener Zeit geschüttelt; endlich haben wir folgendes Verfahren geübt: eine Minute mit Wasser in Menge von einem Viertel des Volumens schütteln, dann gehen 20 bis 24 Proz. der Hippursäure in die Spülflüssigkeit über und bleiben 6 bis 10 Proz. des Harnstoffs im Essigäther.

Es ist klar, daß man die Hippursäure des Spülwassers bei der Analyse nicht vernachlässigen darf. Man bekommt indessen diese Säure leicht wieder, wenn man das Wasser eine Minute mit einer gleichen Menge Essigäther schüttelt. Alle Hippursäure des Wassers geht dann in den Essigäther über, der dann zur ersten Portion zugefügt werden muß. Es ist eigentlich überraschend, daß man den Urin so sechsmal hintereinander in einer Minute mit frischem Essigäther behandeln muß, um ihm die Hippursäure zu entziehen, während für das Spül-

wasser das einmalige Schütteln einer Minute genügt. Aber man muß daran denken, daß die Hippursäure viel schwieriger in den Essigäther übergeht, wenn sie sich im Harn befindet, im Zustande der Lösung in einem sehr komplizierten Gemisch, als wenn man mit einer einfachen wässerigen Lösung der Säure zu tun hat. Die letzte Schwierigkeit liegt in dem Harnstoff, der im Essigäther trotz des Auswaschens mit Wasser zurückgeblieben ist. Die Entfernung dieses Ureums kann auf zwei Methoden geschehen:

1. Niederschlagen mit Xanthydrol.
2. Durch Zerstörung mit Bromlauge.

Eine dritte Möglichkeit, Zersetzung durch die Urease, kam für uns nicht in Betracht, weil wir ja die Menge der Hippursäure durch eine Stickstoffbestimmung berechnen wollten. Wir konnten daher unseren Flüssigkeiten keine stickstoffreichen Substanzen, wie es die Lösungen von Urease sind, zusetzen.

Den Harnstoff mit Xanthydrol niederzuschlagen, ist eine elegante Methode, deren Einführung wir hauptsächlich *Fosse* (6) verdanken. Aber die Niederschlagsbildung braucht Zeit, und vor allem ist es schwierig, restlos alles auszufällen. In den Filtraten findet man immer wieder Spuren von Harnstoff, welche neuen Zusatz von Xanthydrol und ein erneutes Filtrieren erfordern. Endlich ist das Xanthydrol teuer und war oft schwierig zu beschaffen.

Die Zerstörung des Harnstoffs durch eine Bromlösung ist viel einfacher, und es ist leicht, den gasförmigen Stickstoff durch Schütteln zu verjagen. Allerdings ist richtig, daß einige Prozente (7 bis 8) nicht durch das Brom zerstört werden. Es ist aber leicht, die Größe des begangenen Fehlers zu berechnen und auf folgende Weise zu eliminieren.

Alle Essigätherportionen, benutzt zur Extraktion des Urins und der Spülflüssigkeit, werden vereint und auf dem Wasserbade bis ungefähr zur Trockne abdestilliert. Der Rückstand wird sorgfältig in einem Meßkolben in 50 ccm Alkohol aufgelöst.

Mittels Pipetten werden zweimal 20 ccm und einmal 10 ccm in Kjeldahlkolben gebracht. Der Inhalt wird im Wasserbade bis zur Trockne abgedampft. Zu den ursprünglich 20 ccm Flüssigkeit enthaltenden Kolben fügt man 10 ccm Bromlaugelösung zu, schüttelt diese beiden Kolben 3 Minuten energisch und bestimmt dann in allen drei (die beiden von 20 ccm mit 10 ccm Bromlauge und den einen mit 10 ccm ohne Brom) den Stickstoff nach Kjeldahl (5 ccm Kjeldahlschwefelsäure, eine Messerspitze K_2SO_4 und $CuSO_4$, blanke Flamme; Übertreiben in n/50 H_2SO_4 mit 50 ccm 33 proz. NaOH, bis 150 ccm destilliert sind; titrieren mit n/50 NaOH, Indikator Methylrot). Es scheint uns empfehlenswert, die Destillation in einem *Kupferapparat* zu machen, da die Fehler geringer als in einem Glasapparat sind.

Die stets vorgenommenen blinden Versuche ergeben einen Reagenzienfehler von nicht mehr als 0,50 ccm n/50 Lauge.

Im folgenden also die ganze Methode:

Zu 50 ccm Urin setzt man 12,5 g Kochsalz, zur Vermeidung der lästigen Emulsionsbildung beim Schütteln mit Essigäther, und 0,3 ccm 38proz. Salzsäure zu, um alle Hippurate in Hippursäure zu verwandeln. Dann schüttelt man den Urin energisch eine Minute lang mit 50 ccm Essigäther in einem Schütteltrichter. Nach Trennung der Flüssigkeit in zwei Schichten dekantiert man den Essigäther und schüttelt wieder die wässerige Schicht mit 50 ccm frischen Essigäthers. Man wiederholt dies sechsmal. Man vereinigt alle Portionen Essigäther (etwa 300 ccm) und schüttelt sie energisch eine Minute lang mit 75 ccm aqua dest. Nach Trennung in zwei Flüssigkeitsschichten schüttelt man die Spülflüssigkeit eine Minute lang mit 75 ccm Essigäther und fügt diese zu den vorigen 300 ccm zu. Man verdampft jetzt den ganzen Essigäther (ungefähr 375 ccm), der Rest wird in 50 ccm Alkohol (oder Essigäther) gelöst, von dem man mittels Pipette zweimal 20 ccm und einmal 10 ccm in die Kjeldahlkolben bringt. Der Alkohol oder Essigäther wird auf dem Wasserbade verdampft, dann setzt man den Kolben, welche 20 ccm Flüssigkeit enthielten, 10 ccm Bromlauge zu. Man schüttelt eine Minute lang und bestimmt dann nach *Kjeldahl*. In der Vorlage sind 10 ccm n/50 H_2SO_4. Aus folgendem Beispiel ergibt sich die Berechnung. Bei der Titration brauchte man z. B. für die zwei Kolben, welche 20 ccm alkoholische Lösung und 10 ccm Bromlauge enthielten, 4,40 und 4,30 ccm n/50 Lauge; für den Kolben, der 10 ccm alkoholischer Lösung enthielt und der keine Bromlauge bekam, brauchte man 5,30 ccm Lauge.

Nach Subtraktion von 0,5 ccm für die Reagenzien (blinde Analysen) findet man also in diesem Falle, nach Schütteln mit 20 ccm Bromlauge, daß die Flüssigkeit noch eine Menge Stickstoff enthielt, übereinkommend mit 10 — 4,40 — 0,50 = 5,10 bzw. 5,20 ccm n/50 Lauge (im Mittel 5,15 ccm) (A).

Der Stickstoff der 10 ccm Flüssigkeit, der man kein Brom zugesetzt hatte, kommt mit 4,20 ccm Lauge (B) überein.

Die 50 ccm Alkohol, in denen wir die ausgezogene Hippursäure gelöst haben, einschließlich des Harnstoffs, der nicht mit der Spülflüssigkeit entfernt wurde (Kolben B), enthielt also im ganzen (Harnstoff + Hippursäure)

$$5 \cdot 4{,}20 \cdot 0{,}28 = 5{,}88 \text{ mg } N_2.$$

Nach der Entfernung des Harnstoffs durch die Bromlauge enthielten die 50 ccm Alkohol noch entsprechend dem Mittel der Kolben A:

$$2{,}5 \cdot 5{,}15 \cdot 0{,}28 = 3{,}61 \text{ mg } N_2.$$

Die Menge Harnstoff, welche im Essigäther verblieb, hatte also für 50 ccm einen N_2-Gehalt von

$$5{,}88 - 3{,}61 = 2{,}27 \text{ mg } N_2.$$

7 Proz. dieser Menge werden durch das Brom nicht zerstört, so daß pro 20 ccm der alkoholischen Lösung noch bleiben:

$$^2/_5 \cdot {}^7/_{100} \cdot 2{,}27 \text{ mg Harnstoff-Stickstoff, d. h.}$$

$$^2/_5 \cdot {}^7/_{100} \cdot \frac{2{,}27}{0{,}28} = 0{,}23 \text{ ccm n/50 Lauge.}$$

Bei Auswertung der Analyse muß man in diesem Falle die 0,23 ccm Lauge berücksichtigen, entsprechend den Spuren Harnstoff, welche der Zerstörung durch die Bromlauge entgangen sind.

Man findet also, daß in je 20 ccm die Menge Hippursäure-Stickstoff äquivalent ist 5,15 — 0,23 = 4,92 ccm n/50 Lauge. 50 ccm Urin enthalten also:

$$2{,}5 \cdot 4{,}92 \cdot 0{,}28 \cdot 12{,}78 \text{ mg Hippursäure.}$$

0,28 ist die Zahl für die Stickstoffmilligramme, welche 1 ccm n/50 Lauge entsprechen, und 1 mg Stickstoff entspricht 12,78 mg Hippursäure.

Es ist klar, daß zwei Fehler diese Methode beeinflussen können.

1. All der im Essigäther gefundene Stickstoff wird nach Subtraktion des Harnstoff-Stickstoffs als Hippursäure berechnet. Es bleibt die Frage, ob der Urin nicht andere stickstoffhaltige Materien enthält, welche so leicht im Essigäther löslich sind, daß sie durch Schütteln mit einer ein Viertel so großen Menge Wasser nicht entfernt werden können. Daher ist jedenfalls auch zu empfehlen, den Kranken, deren Urin man auf den Gehalt an Hippursäure nachsehen will, keine stickstoffhaltigen Medikamente wie Veronal zu geben. Vielleicht verursachen die Gallensäuren auch einen kleinen Irrtum.

Als sicher hat sich aber andererseits ergeben, daß Personen, die man einer Diät unterwirft, welche wenig oder gar keine Benzoesäure enthält (Milchdiät), nach der hier beschriebenen Methode nur Spuren von Hippursäure zeigen. Daraus geht also hervor, daß diese hypothetischen, im Essigäther löslichen Stickstoffsubstanzen, welche im Urin neben der Hippursäure und dem Harnstoff vorkommen müßten, z. B. Phenacetursäure, nur in ganz kleinen Mengen vorhanden sein können. Der mögliche Fehler in dieser Richtung ist also so klein, daß er keinen Einfluß auf das Ergebnis unserer Untersuchungen hat, wo wir diese Methode angewandt haben.

2. Die zweite Frage ist, ob man mit dieser Methode die *ganze* Hippursäure im Harn bestimmt. Um diese Frage zu klären, haben wir zuerst die Hippursäuremenge in einer Harnprobe bestimmt, dann fügten wir eine bestimmte Menge Hippursäure zu, wonach wir von

neuem den Gehalt bestimmten. Diese zweite Analyse hat uns immer ein befriedigendes Resultat ergeben, wie die folgende Tabelle zeigt.

Harnmenge ccm	Hippursäure in diesen 100 ccm Urin mg	Zugesetzte Hippursäure mg	Totale Menge mg	Gefunden mg
100	27,16	90	117,16	113,41 d. h. 86,3 statt 90
100	92,09	70	162,09	164,05 d. h. 72 statt 70
100	33,43	250	283,43	289,03 d. h. 255,6 statt 250
100	33,87	180	213,87	208,8 d. h. 175 statt 180
100	31,57	500	531,57	539,7 d. h. 502,1 statt 500
100	34,39	50	84,39	86,72 d. h. 52,3 statt 50

Harn, der Eiweiß enthält, muß davon erst befreit werden. Zu diesem Zwecke wird der Urin gekocht und tropfenweise Phosphorsäure bis zur Bildung eines flockigen Bodensatzes zugesetzt.

Die Anwendung von Essigsäure ist im allgemeinen bei diesen Analysen, also auch bei der Enteiweißung, zu vermeiden. Die Essigsäure ist leicht löslich in Essigäther. Wenn man also den Urin sechsmal mit Essigäther behandelt hat und die Essigsäure hierin übergegangen ist, so bleibt die Essigsäure im Essigäther auch nach Behandlung mit Wasser. Da diese Säure einen Teil des Harnstoffs zurückhält, vermehrt dies augenscheinlich den Analysenfehler. Man muß also von vornherein darauf achten, daß der Essigäther keine Essigsäure enthält. Dies ist im besonderen beim Essigäther der Fall, der nach dem Gebrauch wieder destilliert wird. Daher haben wir auch immer den Essigäther vor seiner neuen Anwendung erst mit Wasser geschüttelt, um so vollständig wie nur möglich etwa restierende Essigsäure zu entfernen.

Endlich haben wir immer sorgfältig vermieden, den Urin vor der Behandlung zu konzentrieren, wie man es bei den meisten anderen Methoden tut. Tatsächlich haben *Folin* und *Flanders* (7) deutlich bewiesen, daß Konzentrierung des Harns bei schwach alkalischer Reaktion genügt, um die ganze Hippursäure in Glykokoll und Benzoesäure zu zersetzen.

Nach ihrer Meinung erklären sich die Meinungsverschiedenheiten bezüglich der Synthese der Hippursäure zum großen Teil durch die Tatsache, daß bei mehr oder weniger starker Konzentrierung des Harns eine mehr oder weniger große Menge Hippursäure der Analyse durch Spaltung entzogen wird. Wir haben daher niemals versucht, die Analyse durch Eindampfen des Urins zu erleichtern. Außerdem ist unsere

Methode selbst für den an Hippursäure armen Urin so empfindlich, daß man auch bei Analyse von nur 50 ccm nicht vorher konzentrierten Urins befriedigende Zahlen erhält. Eine Spaltung der Hippursäure, wie sie beim Konzentrieren geschieht, ist die nämliche, wie sie durch Bakterien entsteht (8). Daher haben wir den Urin in Gläsern, die eine Mischung von Chloroform und Toluol enthielten, aufgefangen.

Bei Einhaltung der beschriebenen Vorsichtsmaßregeln und genauer Befolgung der Technik verfügt man über eine Methode, mit der man leicht den Stoffwechsel der Hippursäure bei einer Reihe von Kranken feststellen kann (9). Die Methode ist so einfach, daß ein einzelner Beobachter leicht an einem Tage den Gehalt in vier Harnportionen an Hippursäure von je 50 ccm bestimmen kann.

Literatur.

1) *Bunge* und *Schmiedeberg*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **10**. — 2) *S. Friedmann* und *Tachau*, diese Zeitschr. **85**. — 3) Siehe bezüglich dieses Problems *Neubauer* und *Huppert* **2**, 826; *Abderhalden*, Biochem. Handlexikon IV und VIII. — 4) *Blumenthal*, Zeitschr. f. klin. Med. **40**. — *Blumenthal* und *Braunstein*, Hofm. Beiträge **8**. — 5) *Soetheer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**. — 6) *Fosse*, Ann. l'Inst. Pasteur **30**, 1916. — 7) *Folin* und *Flanders*, Journ. of biol. Chem. **11**. — 8) *Stokvis* und *van de Velde*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 58. — 9) *Snapper* und *Grünbaum*, Klin. Wochenschr. 1924.

Über die Hippursäuresynthese in der überlebenden Niere von verschiedenen Tiergattungen, auch vom Menschen.

Von

I. Snapper, A. Grünbaum und **J. Neuberg.**

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie und dem Institut für Physiologie der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 13. Dezember 1923.)

Seit den klassischen Untersuchungen von *Bunge* und *Schmiedeberg* wissen wir, daß die Niere nicht nur exkretorische Funktionen entfaltet, sondern auch Synthesen zustande bringen kann. Wird Benzoesäure per os genommen, so erscheint im Harn diese Benzoesäure, gekuppelt an Glykokoll, d. h. als Hippursäure. *Bunge* und *Schmiedeberg* haben nachgewiesen, daß die Hippursäuresynthese in der Niere stattfindet. In ihrem berühmten Versuch wird die überlebende Niere mit Blut durchströmt, dem Benzoesäure und Glykokoll zugesetzt sind. Nach der Durchströmung kann man im Blute, in der Nierensubstanz und im Ureterfiltrat eine nicht unbeträchtliche Menge Hippursäure nachweisen. Hiermit war der Beweis geliefert, daß die Synthese der Hippursäure in der Niere stattfinden kann[1]).

Ferner zeigten *Bunge* und *Schmiedeberg* noch, daß beim *Hunde* die Niere das *einzige* Organ der Hippursäurebildung ist. Unterbanden sie nämlich bei einem Hunde die Nierengefäße und spritzten sie dann intravenös Benzoesäure und Glykokoll ein, so konnten sie nach einer Stunde keine Hippursäure im Blute nachweisen. Wenn sie dagegen bei einem Hunde nach Unterbindung der Ureteren Benzoesäure und Glykokoll intravenös einspritzten, so war die Hippursäure schnell im Blute zu finden. Aus diesen Versuchen ergab sich also, daß beim Hunde die Hippursäure nur in der Niere und nicht in einem anderen Organ gebildet wird.

---

[1]) *Bunge* und *Schmiedeberg*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **6**; bestätigt unter anderen von *Kochs*, Pflügers Arch. **20**, 64; *Bashford* und *Cramer*, Zeitschr. f. phys. Chem. **36**, 224.

Dieser letzte Schluß wird im Jahre 1915 von den amerikanischen Untersuchern *Kingsbury* und *Bell* bestritten[1]). Nicht die Bildung der Hippursäure beim Hunde in der Niere bestreiten sie, sondern nur die ausschließliche Lokalisation dieser Tätigkeit in der Niere. Sie meinen nämlich nachweisen zu können, daß die Kuppelung von Benzoesäure an Glykokoll zu Hippursäure auch in anderen Organen als der Niere stattfindet. Wenn sie nach doppelseitiger Nierenexstirpation beim Hunde Benzoesäure einspritzten, meinten sie, nach einigen Stunden im Blute wohl Hippursäure finden zu können. An dieser Stelle wollen wir nur darauf hinweisen, daß *Kingsbury* und *Bell* in ihren Versuchen eigentlich mit Ausnahme *eines* Versuchs den Nachweis der Hippursäuresynthese schuldig geblieben sind. Sie fanden nämlich im Blute der entnierten Hunde nach der Einspritzung von Benzoesäure und Glykokoll eine gebundene Benzoesäure, d. h. Benzoesäure, die an irgend eine Substanz gebunden war, ohne nachzuweisen, daß die Benzoesäure an Glykokoll gekuppelt war. Nur in einem Versuche haben sie die Übereinstimmung dieser gebundenen Benzoesäure mit Hippursäure wirklich erwiesen. Nichtsdestoweniger schließen sie aus der Anwesenheit der gebundenen Benzoesäure auf das Vorhandensein von Hippursäure und meinen deshalb, daß die Hippursäuresynthese auch in anderen Organen als den Nieren stattfinden muß.

Wegen der prinzipiellen Bedeutung dieser Resultate haben wir die Versuche von *Bunge* und *Schmiedeberg* wiederholt, und zwar erst die berühmte Durchströmung der überlebenden Niere mit Blut, dem benzoesaures Natrium und Glykokoll zugesetzt sind.

Die Durchströmungen wurden angestellt im physiologischen Institut (Dir. Prof. *van Rijnberk*) mit dem *Embden*schen Apparat. Bei dem Anstellen des Durchströmungsversuchs müssen folgende Details berücksichtigt werden:

a) Der Apparat darf nicht zu wenig Blut enthalten; ist die Menge Blut zu klein, dann besteht die Gefahr der Schaumbildung und die Nierenkapillaren werden durch Luftembolien verlegt.

b) Die Kanüle muß in die Art. renalis gebunden werden, während das Blut schon aus der Kanüle fließt, sonst besteht ebenfalls die Gefahr der Luftembolie.

c) Das Blut, das in der ersten Minute aus der V. renalis herausströmt, muß verworfen werden, weil es immer Koagula enthält. Mit diesen Kautelen gelingt die Durchströmung fast immer, und man kann die *Bunge-Schmiedeberg*schen Resultate bestätigen, wie sich aus folgenden Protokollen ergibt.

I. Hundeniere, durchströmt mit 600 ccm defibriniertem Hundeblut, dem 1,5 g Glykokoll und 2,4 g Natrium benzoicum zugesetzt sind. Die Durchströmung dauert 3½ Stunden; während dieser Zeit gehen 8 Liter Blut durch die Niere hindurch.

---

[1]) *Kingsbury* und *Bell*, Journ. of biol. Chem. 28, 1915.

Das Blut wird mit der achtfachen Menge Alkohol gefällt. Der Alkohol wird in vacuo abdestilliert, der Alkoholrest erst bei alkalischer Reaktion mit Äthylacetat ausgeschüttelt, dann bei saurer Reaktion. Bei dieser letzten Behandlung geht die Hippursäure in das Äthylacetat über. Das Äthylacetat wird abdestilliert, der Rest mit Petroläther gefällt und aus dem Niederschlag durch Kristallisation 51 mg reine Hippursäure gewonnen[1]).

II. Hundeniere, durchströmt mit 530 ccm defibriniertem Hundeblut, dem 1,5 g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Die Durchströmung dauerte 2½ Stunden; während dieser Zeit passieren 6 Liter Blut die Niere.

Aus 338 ccm Blut werden mit der obengenannten Methode 52 mg Hippursäure erhalten.

III. Hundeniere, durchströmt mit 600 ccm defibriniertem Hundeblut, dem 1,5 g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Die Durchströmung dauert 3 Stunden; während dieser Zeit passieren 10 Liter Blut die Niere. Aus dem Ureter sind während des Versuchs 200 ccm hämorrhagischer Flüssigkeit geflossen.

Aus 175 ccm des Ureterfiltrats kristallisierten nach obengenannter Bearbeitung **66 mg** Hippursäure, aus 300 ccm Blut **28 mg** Hippursäure. Die durchströmte Niere wurde zerrieben und mit Alkohol extrahiert. Aus diesem Alkoholextrakt wurden **74 mg** Hippursäure auskristallisiert.

Wir können deshalb die *Bunge-Schmiedeberg*schen Versuche bestätigen: bei der Durchströmung einer überlebenden Hundeniere mit Blut, dem benzoesaures Natrium und Glykokoll zugesetzt sind, entsteht lokal in der Niere Hippursäure.

Auch die Frage, ob beim Hunde die Niere das *einzige* Organ ist, wo die Hippursäure entstehen kann, haben wir in eigenen Versuchen geprüft. Hierbei haben wir uns genau an die Versuchsbedingungen von *Kingsbury* und *Bell* gehalten.

1. Bei einem Hunde von 8,1 kg wurden beide Nieren exstirpiert. Gleich nach der Operation wurden 3 g benzoesaures Natrium und 1½ g Glykokoll intravenös eingespritzt. 4 Stunden nachher wurde der Hund durch Verblutung getötet. In 110 ccm Blut war keine Hippursäure nachzuweisen. Die Leber (169 g) wurde zerrieben und mit Alkohol extrahiert. Hieraus konnte keine Hippursäure kristallisiert werden.

2. Bei einem Hunde von 14,25 kg wurden beide Nieren exstirpiert. Hiernach subkutane Injektion von 12 g benzoesaurem Natrium und 6 g Glykokoll. Nach 24 Stunden war der Hund in gutem Zustande. Er wurde durch Verblutung getötet. In 600 ccm Blut war keine Hippursäure nachzuweisen. In der Leber auch nicht.

3. Bei einem Hunde von 7 kg wurden beide Nieren exstirpiert. Gleich nachher subkutane Injektion von 10 g benzoesaurem Natrium und 5 g Glykokoll. Nach 5 Stunden war der Hund sehr krank, hatte Krämpfe und konnte nicht laufen. Er wurde durch Verblutung getötet. In 300 ccm Blut keine Hippursäure, in der Leber auch nicht.

Im Gegensatz zu *Kingsbury* und *Bell* konnten wir auch die zweite *Bunge-Schmiedeberg*sche Behauptung bestätigen: beim Hunde wird die Hippursäure *nur* in der Niere und in keinem anderen Organ gebildet.

---

[1]) Methode von *Friedmann* und *Tachau*, diese Zeitschr. **85**.

Inzwischen gelten die genannten Tatsachen über die Hippursäuresynthese vorläufig *nur* für den *Hund*, denn aus der Literatur ergibt sich, daß bei anderen Tiergattungen die Hippursäuresynthese sicher nicht in der Niere stattfindet. *Bunge* und *Schmiedeberg* selbst haben dies schon für den Frosch nachgewiesen: sie exstirpierten bei 14 Fröschen die Nieren und spritzten nachher benzoesaures Natrium und Glykokoll in den Rückenlymphsack. Nach 24 Stunden lebten noch 11 Tiere. Diese wurden mit Äther getötet, zerhackt und der Brei wurde auf Hippursäure untersucht. Mittels der bekannten Methode wurden 25 mg Hippursäure erhalten.

Analoge Tatsachen kennt man bei der Hippursäuresynthese des Kaninchens. *Salomon* hat nachgewiesen, daß, wenn man dem Kaninchen nach der doppelseitigen Nephrektomie benzoesaures Natrium und Glykokoll einspritzt, im Blute Hippursäure nachgewiesen werden kann. *Friedmann* und *Tachau* durchströmten die Kaninchenleber mit Blut, dem benzoesaures Natrium und Glykokoll zugesetzt waren, und fanden so, daß die Kaninchenleber zur Hippursäuresynthese imstande ist. *Bunge* und *Schmiedeberg* hatten bei analoger Versuchsanordnung bei der Hundeleber nie eine Hippursäuresynthese nachweisen können. Hieraus ergeben sich tiefgreifende Unterschiede zwischen dem Hippursäurestoffwechsel des Hundes und des Kaninchens.

Die *Bunge-Schmiedeberg*sche Feststellung der Hippursäuresynthese in der Niere darf deshalb nicht ohne weitere Untersuchung auf andere Tierarten, a fortiori nicht auf die menschliche Pathologie übertragen werden. Wir haben darum die oben beschriebenen Durchströmungsversuche an Hundenieren mit Schweins- und Schafsnieren wiederholt: das Schwein ist bekanntlich ein Omnivore, der in vielen Hinsichten mit dem Menschen übereinstimmt, das Schaf ist ein Herbivore, der also in seinem Stoffwechsel wahrscheinlich mit dem Kaninchen einige Übereinstimmung zeigen wird. Bei dem Schweine fanden wir bei der Durchströmung der überlebenden Nieren mit Blut unter Zusatz von benzoesaurem Natrium und Glykokoll eine deutliche Hippursäuresynthese.

I. Schweinsniere, 2 Stunden durchströmt mit 700 ccm defibriniertem Schweinsblut, dem 1,5 g Glykokoll und 2,6 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Während der Durchströmung passieren 8½ Liter Blut die Niere.

Nach der Durchströmung konnten aus 375 ccm Blut 50 mg Hippursäure gewonnen werden. Aus 190 ccm Ureterfiltrat konnten 29 mg Hippursäure kristallisiert werden.

II. Schweinsniere, durchströmt mit 800 ccm Schweinsblut, dem 1½ g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Während des Versuchs passierten 16,8 Liter Blut die Niere.

Nach der Durchströmung konnten aus 350 ccm Blut 100 mg Hippursäure gewonnen werden. Aus 70 ccm Ureterfiltrat wurden 25 mg Hippursäure kristallisiert.

Als wir dieselben Versuche mit überlebender Schafsniere anstellten, konnten wir im Anfang nach der Durchströmung keine Hippursäure nachweisen, wie sich aus folgenden Protokollen ergibt.

I. Schafsniere, durchströmt mit 700 ccm Schafsblut, dem 1½ g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Während des Versuchs passierten 6 Liter Blut die Niere.

Nach der Durchströmung konnte aus 525 ccm Blut *keine* Spur Hippursäure gewonnen werden. Aus 80 ccm Ureterfiltrat wurden nach großer Mühe einige Nädelchen erhalten, die vielleicht als Hippursäure anzusprechen sind; die Mengen sind aber viel zu klein, um die winzigen Kriställchen zu identifizieren.

II. Schafsniere, durchströmt mit 700 ccm Schafsblut, dem 1½ g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Während des Versuchs passierten 31 Liter Blut die Niere.

500 ccm des Durchströmungsblutes wurden auf Hippursäure verarbeitet, ohne daß Hippursäure nachgewiesen werden konnte. Auch in 75 ccm Ureterfiltrat konnte keine Hippursäure gefunden werden.

III. Schafsniere, durchströmt mit 700 ccm Schafsblut, dem 1½ g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Während des Versuchs passierten 10,8 Liter Blut die Niere.

570 ccm des Durchströmungsblutes wurden auf Hippursäure verarbeitet, ohne daß Hippursäure nachgewiesen werden konnte. Auch in 50 ccm Ureterfiltrat konnte keine Hippursäure gefunden werden.

IV. Schafsniere, durchströmt mit 700 ccm Schafsblut, dem 1½ g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt sind. Während der Durchströmung passierten 13½ Liter Blut die Niere.

450 ccm des Durchströmungsblutes wurden ohne Resultat auf Hippursäure untersucht. Aus der durchströmten Niere konnten mit großer Mühe 8 mg Hippursäure erhalten werden.

Nach diesen Versuchen sollte man also schließen, daß beim Schafe, ebenso wie beim Kaninchen, die Synthese der Hippursäure in der Niere nur in geringem Maße stattfinden kann. Dennoch ist dieser Schluß nicht gerechtfertigt: durch Modifikation der Menge benzoesauren Natriums, welche dem Durchströmungsblute zugesetzt wird, kann man auch beim Schafe positive Resultate bei der Durchströmung erhalten und nachweisen, daß auch in der Schafsniere lokal Hippursäure gebildet wird.

Wenn man in obengenannten Versuchen dem Durchströmungsblute statt 2,4 g 150 mg dieser Substanz zusetzt, ergibt sich, daß auch in der Schafsniere eine deutliche Hippursäuresynthese stattfindet.

V. Schafsniere, durchströmt mit 700 ccm Schafsblut, dem 1½ g Glykokoll und 150 mg benzoesaures Natrium zugesetzt sind.

In 530 ccm des Durchströmungsblutes konnten nach dem Versuch nur einige Milligramme Hippursäure nachgewiesen werden. In 100 ccm Ureter-

filtrat wurden aber 21 mg Hippursäure gefunden, während aus der durchströmten Niere nach Zerreiben und Extraktion mit Alkohol 52 mg Hippursäure gewonnen werden konnten.

VI. Schafsniere, durchströmt mit 750 ccm Blut, dem 1½ g Glykokoll und 150 mg benzoesaures Natrium zugesetzt sind.

Nach der Durchströmung wurden in 350 ccm des Blutes 20,5 mg Hippursäure nachgewiesen. Aus 300 ccm Ureterfiltrat wurden 52 mg Hippursäure gewonnen, aus der durchströmten Niere nach Zerreiben und Extraktion mit Alkohol 37,6 mg Hippursäure.

Merkwürdigerweise zeigt sich also bei diesen Versuchen, daß die Menge benzoesauren Natriums und Glykokolls, welche bei der Durchströmung von Hunde- und Schweinsnieren eine deutliche Hippursäuresynthese ergibt, für die Durchströmung der Schafsniere nicht geeignet ist. Die Schafsniere ist nur dann imstande, Hippursäure zu bilden, wenn *kleine* Mengen benzoesauren Natriums dem Durchströmungsblute beigemischt sind. Während bei der Durchströmung von Hunde- und Schweinsnieren 2,5 g benzoesaures Natrium dem Blute zugesetzt wurden und man nach dem Versuch eine deutliche Hippursäuresynthese nachweisen konnte, ergab sich, daß bei derselben Versuchsanordnung für eine Schafsniere nur 150 mg benzoesaures Natrium dem Durchströmungsblute beigefügt werden müßten, um eine deutliche Hippursäuresynthese zu erhalten. Wird dem Blute mehr Benzoesäure zugesetzt, so ist die Schafsniere nicht mehr imstande, die Hippursäure zu bilden. Es liegt auf der Hand, zu denken, daß die Funktion der Schafsniere durch größere Mengen benzoesauren Natriums gestört wird.

Bevor man den Hippursäurestoffwechsel beim *Menschen* und speziell beim Kranken studiert, muß festgestellt werden, ob die menschliche Niere imstande ist, lokal Hippursäure zu bilden. Nur der direkte Versuch, d. h. die Durchströmung einer überlebenden Menschenniere, kann eine Antwort auf diese Frage geben. Ein derartiger Versuch kann aber nur selten angestellt werden, weil eine funktionstüchtige Menschenniere nur selten exstirpiert wird. Überdies ist für die Durchströmung der Niere ein nicht allzu kurzer Gefäßstiel unerläßlich, denn für den Versuch muß sowohl in die Vena als in die Arteria renalis eine Kanüle gebunden werden. Wir waren zweimal in der Lage, eine funktionstüchtige *Menschen*niere zu durchströmen.

Fall 1.

Bei einer Patientin mit beginnender Nierentuberkulsose ergab sich bei der funktionellen Untersuchung, daß die Funktion der kranken Niere nur verhältnismäßig wenig gestört war. Das Indigocarmin wurde von der gesunden Niere nach 8 Minuten, von der kranken Niere nach 12 Minuten mit kräftigem Strahl ausgeschieden. Der Stickstoffgehalt des Urins der gesunden Niere war 0,496 Proz., der kranken Niere 0,26 Proz.

Gleich nach der Exstirpation wurde die tuberkulöse Niere mit 600 ccm Menschenblut, dem 1,5 g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt waren, durchströmt.

Die Durchströmung gelang sehr gut: bei einem Druck von nur 10 cm Hg passierten pro Minute je 270 ccm Blut die Niere, so daß im ganzen 48 Liter Blut die Niere passierten. Das Blut war also wenigstens 80mal durch die Niere geführt.

Nach der Durchströmung wurden aus dem Blute 60 mg Hippursäure erhalten. Wie in allen vorigen Versuchen, haben wir auch hier die Kristalle genau als Hippursäure identifiziert. Wegen der prinzipiellen Bedeutung dieses Versuchs geben wir hier die erhaltenen Zahlen an. Nadelförmige Kristalle, Schmelzpunkt 187°, Stickstoffgehalt 7,80 Proz. (berechnet 7,82 Proz.), löslich in heißem Wasser, Alkohol und Äthylacetat, unlöslich in Petroläther.

Fall 2.

Bei einer Patientin mit einem Nierengeschwulst ergab sich vor der Operation, daß die Funktion der kranken Niere noch nahezu intakt war. Gleich nach der Operation wurde die exstirpierte Niere durchströmt mit 620 ccm Menschenblut, dem 1½ g Glykokoll und 2,4 g benzoesaures Natrium zugesetzt waren. Während der Durchströmung passierten 9 Liter Blut die Niere; das Blut war also ungefähr 15mal durch die Niere gegangen. Nach der Durchströmung wurden aus 545 ccm Blut 58 mg Hippursäure erhalten. Ein Teil der durchströmten Niere wurde zerrieben und mit Alkohol extrahiert: auch hierin wurden 17 mg Hippursäure kristallisiert.

Das *Ergebnis* dieser langwierigen und schwierigen Versuche ist also einwandsfrei das folgende: *im Durchströmungsversuch kann die überlebende Hunde-, Schweins- und Schafsniere die Hippursäuresynthese aus Benzoesäure und Glykokoll zustande bringen.*

Auch in der menschlichen Niere findet die Synthese der Hippursäure aus Benzoesäure und Glykokoll statt.

Es sei schon hier nachdrücklich darauf hingewiesen, daß auch im Experiment *Synthese* der Hippursäure und *Ausscheidung* dieser Substanz ganz getrennte Funktionen sind. Wenn die Durchströmung der Niere bei geringem Drucke stattfindet, zeigt sich kein Ureterfiltrat: die Ausscheidungsfunktion der Niere ist unter diesen Umständen offenbar fast Null. Dennoch wird viel Hippursäure in der Niere gebildet, weil sie aber nicht mit dem Harn ausgeschieden wird, häuft sie sich im Blute an. In einer späteren Mitteilung[1]) werden wir sehen, daß sich auch in der menschlichen Pathologie Zustände mit schwerer Schädigung der exkretorischen Funktion der Niere für Hippursäure bei erhaltener synthetischer Funktion finden. Dementsprechend kann in Analogie mit dem Durchströmungsversuch beim kranken Menschen eine Hippursäureanhäufung im Blute zustande kommen.

[1]) *Snapper* und *Grünbaum*, Klin. Wochenschr. 1924.

Fructosediphosphatase in menschlichen Organen. I.

Von

Elemér Forrai.

(Aus dem königl. ungarischen pflanzenbiochemischen Institute Budapest und aus dem chemischen Institute der Universität Szeged.)

(Eingegangen am 13. Dezember 1923.)

Unter den organischen Phosphorverbindungen verdienen die Phosphorsäureester der Kohlenhydrate eine besondere Beachtung. Nach den Untersuchungen von *Neuberg, Bang, Kossel* und *Scheidel* scheint es, daß den Nucleinsäuren ein Kohlenhydratphosphorsäureskelett zugrunde liegt, an das sich andere Gruppen (Pyrimidine, Purine) angliedern. Einzelnen Nucleinsäuren liegt eine Pentosephosphorsäure[1]), so der erste erkannte Pentosephosphorsäureester, anderen eine Hexosephosphorsäure[2]) zugrunde. Bei bestimmten phosphorhaltigen Lipoiden handelt es sich um Galaktosephosphorsäure.

Die nachstehenden Untersuchungen — die ich auf Veranlassung des Herrn Prof. *Bodnár* ausführte — beziehen sich auf die enzymatische Spaltung des fructosediphosphorsauren Natriums durch menschliche Organe und bieten wegen der wichtigen biologischen Rolle der Verbindung sowie der enzymatischen Spaltung derselben ein besonderes Interesse.

Harden und *Young*[3]) zeigten es als erste, daß, wenn zum Hefenpreßsaft Phosphate zugefügt werden, die Geschwindigkeit der Gärung in großem Maße erhöht wird und daß die Erhöhung der Geschwindigkeit mit der Menge des zugesetzten Phosphats proportional wächst. Genannte Forscher folgerten gleichzeitig, daß es zwischen Zucker und Phosphorsäure zu einer Verbindung kommt. Im Jahre 1907 entdeckte *Ivanoff*[4]), daß Hefenpräparate, wie Dauerhefen und Hefensäfte, imstande sind, zugefügtes anorganisches Phosphat mit Zucker zu verestern. Diese Wirkung beschränkt sich nicht nur auf die Hefe, sondern kann auch, wie es aus den noch unveröffentlichten Untersuchungen *Bodnárs* hervorgeht, bei höheren Pflanzen beobachtet werden. *Harden* und *Young*[3]) klärten die Zusammensetzung dieser Verbindung, und sie schien einem Fructosediphosphorsäureester zu entsprechen.

---

[1]) *C. Neuberg* und *B. Brahm*, diese Zeitschr. **5**, 438, 1905.

[2]) *C. Neuberg*, ebendaselbst **9**, 557, 1908.

[3]) *A. Harden* und *W. Y. Young*, Proc. of the Chem. Soc. **21**, 189, 1905; zitiert nach *A. Harden* und *W. Y. Young*, diese Zeitschr. **32**, 173, 1911.

[4]) *L. Ivanoff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 281, 1907.

Sie wurde als solche von *C. Neuberg, Färber, Levite* und *Schwenk*[1]) erkannt. *Harden* und *Young* nahmen sogar an, daß die Hexosephosphorsäure am Gärakt zwangsläufig beteiligt sein muß. *Neuberg* zeigte jedoch, daß es Hefen gibt, die vergären, ohne zu phosphorylieren. Nach den Untersuchungen *Neubergs*[2]) „liegt der Anteil der Phosphorylierung noch nicht klar zutage, und man wird, ohne eine Bedeutung des Vorganges in Abrede stellen zu wollen, doch kaum behaupten können, daß in der Fructosediphosphorsäure die zwangsläufige Bindungsform des Zuckers beim normalen Gärakt festgestellt worden ist". — Die wichtige Rolle des Fructosediphosphorsäureesters im tierischen Organismus wurde durch *Embden* und seine Mitarbeiter geklärt, indem sie es bewiesen, daß die Glucose im Muskel für die anaerobe Milchsäurebildung zu Hexosediphosphorsäure verestert wird. Das reichliche Auftreten der Milchsäure in der Muskulatur veranlaßte *Embden, Kalberlah* und *Engel*[3]) nachzuprüfen, ob die gebildete Milchsäure den Kohlenhydraten entspricht. Die Versuche führten nicht zu dem erwarteten Ergebnis, da die Menge der gebildeten Milchsäure nicht mit den oft nur in Spuren nachweisbaren Kohlenhydraten in das entsprechende Verhältnis gebracht werden konnte und ein Zusatz von Glykogen und Traubenzucker die Milchsäurebildung nicht steigerte. Diese Ergebnisse veranlaßten *Embden, Griesbach* und *Schmitz*[4]) zur Annahme einer besonders gearteten Milchsäurevorstufe, die sie als „Lactacidogen" bezeichneten. Es wurde gleichzeitig beobachtet, daß eine gesteigerte Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft von Phosphorsäurebildung begleitet ist. Eine vermehrte Phosphorsäureausscheidung durch den Harn nach angestrengter Muskelarbeit war schon durch *G. J. Engelmann*[5]) beobachtet worden. *Th. Weyl* und *H. Zeitler*[6]) hatten in einer Reihe von Versuchen nach Reizung des einen Ischiadicus mit tetanisierenden Strömen die Vermehrung des wasserlöslichen Phosphors festgestellt; der Lecithinphosphor wurde etwas vermindert, aber bei weitem nicht genügend, um die aufgetretene Phosphorsäure zu decken. Diese Versuchsergebnisse sowie die eigenen Befunde von *Embden, Griesbach* und *Schmitz*, wobei sie die neugebildete Phosphorsäure und Milchsäure in äquimolekularen Mengen fanden, führten zu der Annahme, daß das Lactacidogen eine organische Phosphorsäureverbindung sei, die auf fermentativem Wege unter Bildung äquimolekularer Mengen Phosphorsäure und Milchsäure zerlegt wird. *Embdens* Annahme war weiterhin, daß die Säurebildung im Muskelpreßsaft durch ein Mehrangebot der Vorstufe erhöht wird. Bei Zusatz von Fructosediphosphorsäure zum Muskelpreßsaft zeigte sich in den Versuchen von *Embden, Griesbach* und *Schmitz* eine deutliche Mehrbildung von Milchsäure und Phosphorsäure. Die genannten Forscher halten daher die Fructosediphosphorsäure für die Quelle der mehrgebildeten Säuren.

Eine mit der Substanz von *Harden* und *Young* identische Fructosediphosphorsäure wurde sodann in der Phenylhydrazinverbindung des

---

[1]) *C. Neuberg, E. Färber, A. Levite* und *E. Schwenk*, diese Zeitschr. **88**, 245, 1917.

[2]) Ebendaselbst **108**, 320, 1920.

[3]) *G. Embden*, ebendaselbst **45**, 45, 1912.

[4]) *G. Embden, W. Griesbach* und *E. Schmitz*, H. **931**, 1914.

[5]) *G. J. Engelmann*, Arch. f. d. ges. Anat. u. Phys. 1871, S. 14; zitiert nach *Embden*.

[6]) *Th. Weyl* und *H. Zeitler*, H. **6**, 557, 1882; zitiert nach *Embden*, l. c.

Fructosephosphorsäureosazons aus der Muskulatur von Pferd, Kaninchen und Hund isoliert. Lactacidogen ist nur aus der quergestreiften Muskulatur isoliert worden. Systematische, chemisch-anatomische Studien zeigten, daß das Vorkommen der Fructosediphosphorsäure eine allgemeine physiologische Bedeutung habe[1]).

Dafür, daß die Hexosediphosphorsäure eine intermediäre Form des Kohlenhydratmoleküls beim Abbau der Hexose im tierischen Organismus sei, wurden bisher keine *sicheren* Anhaltspunkte gewonnen. *H. Euler* und *Funcke*[2]) fanden, daß nach der Verabreichung von Calciumhexosephosphat per os an Kaninchen die in dem Kohlenhydratester zugeführte Phosphorsäure größtenteils in anorganischer Form ausgeschieden wird und daß der Glycerinextrakt frischer Kaninchendarmschleimhaut aus Hexosephosphat Phosphorsäure abspaltet; Glycerinextrakt aus der Darmschleimhaut des Schweines zeigte nach *H. Eulers*[3]) Versuchen das gleiche Verhalten. Nach den Versuchen von *Hagemann*[4]) besitzt auch der Uteruspreßsaft ein Lactacidogen spaltendes Ferment, so daß er zugesetzte Hexosephosphorsäure verarbeiten kann. Auch im Nieren- und Hodenpreßsaft wurde das gleiche Ferment nachgewiesen. *Battelli* und *Stern* zeigten, daß die Atmung im Muskelgewebe durch Waschen mit Wasser erlischt und durch Zugabe des Extraktes wieder hervorzurufen ist. Sie machten dafür eine Substanz, das „Pnein", verantwortlich. *O. Meyerhof*[5]) fand, daß die Atmung grob zerkleinerter Froschmuskulatur durch mehrfaches Ausziehen mit großen Mengen Wassers erlischt, durch Zugabe des Muskelkochsaftes oder Hefekochsaftes aber wieder hervorgerufen wird. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß das Koenzym der Gärung mit dem Atmungskörper der getöteten Hefe und des Muskelgewebes wenigstens zum Teil identisch ist, was die Hypothese unterstützt, daß die ersten Phasen der Atmung und Gärung nahe verwandt sind. *Embden* und *Laquer*[6]) stellten fest, daß die Glucose im Muskel für die anaerobe Milchsäurebildung zu Fructosediphosphorsäure verestert wird. *Embden* hält trotz der weitgehenden Übereinstimmung der bei Hefegärung auftretenden Hexosediphosphorsäure und des Muskellactacidogens beide Substanzen *nicht für völlig identisch*. *Meyerhof* fand, daß zwischen dem Gärungskoferment und dem Atmungskörper kein wesentlicher Unterschied sei. Nach den Versuchen *Meyerhofs* scheint es sich in *allen tierischen Organen* vorzufinden. *Tomita*[7]) untersuchte in *Neubergs* Institut tierische Organe bezüglich ihres enzymatischen Spaltungsvermögens für die Hexosemonophosphorsäure, die man nach *Neuberg*[8]) durch partiellen Abbau der Fructosediphosphorsäure leicht gewinnen kann. *Tomita* dachte daran, daß der Abbau des Lactacidogens durch Abspaltung eines Phosphorsäuremoleküls auch diese Stufe durchlaufen muß. Er fand, daß die Organe des Warm- und Kaltblüters ein Ferment enthalten, welches die Hexosemonophosphorsäure hydrolysiert. Am stärksten wirkte die Niere, am schwächsten der

---

1) *Schmitz*, Klin. Wochenschr. **1**, 432, 1922.
2) *H. Euler*, *Ingwe Funcke*, H. **77**, 488, 1912.
3) *H. Euler*, H. **79**, 375, 1912.
4) *H. Hagemann*, H. **98**, 54, 1914.
5) *O. Meyerhof*, H. **101**, 165; **102**, 1, 1918.
6) *G. Embden* und *F. Laquer*, H. **98**, 181, 1917.
7) *M. Tomita*, diese Zeitschr. **131**, 170, 1923.
8) *C. Neuberg*, ebendaselbst **88**, 432, 1918.

Muskel. Eine Klärung der Rolle des Lactacidogens in der Muskulatur geschah durch sinnreiche Versuche *Embdens*. *Embden*[1]) untersuchte die Lactacidogenverteilung in der quergestreiften Muskulatur und fand, daß der rascher arbeitende weiße Kaninchenmuskel mehr Lactacidogenphosphorsäure enthält als der ausdauernd arbeitende rote. *Embden* nannte alle organische Phosphorsäure, die nicht Lactacidogenphosphorsäure ist, „Restphosphorsäure". Es kann daher daran gedacht werden, daß der Lactacidogenreichtum einen Zustand erhöhter Arbeitsbereitschaft bedeutet. Die Differenz des Lactacidogengehaltes der Muskulatur an verschiedenen Fröschen entspricht den Schwankungen der Betätigungsbereitschaft. *Embden* denkt daran, daß die Restphosphorsäure bei andauernder Tätigkeit auch in Lactacidogen-Phosphorsäure verwandelt werden kann, und daß das Muskelglykogen eine Reserve für das Lactacidogenkohlenhydrat sei. Nach alledem war es wahrscheinlich, daß das Lactacidogen die Betriebssubstanz des Muskels ist. Es gelang am Kaninchen und Hunde nachzuweisen, daß bei starker Arbeit die Menge der freien Phosphorsäure zu jener der Lactacidogenphosphorsäure abnimmt[2]). Es wurde ferner gezeigt, daß die Phosphorsäure im Säugetiermuskel nur dann frei bleibt, wenn keine erheblichen Kohlenhydratbestände mehr zur Verfügung stehen. Dies wurde dahin gedeutet, daß in Gegenwart von Kohlenhydraten die Phosphorsäure immer wieder durch einen synthetisch-assimilatorischen Prozeß gebunden wird; dadurch gewinnt die Fructosediphosphorsäure die Bedeutung eines Zwischenproduktes beim Abbau der Kohlenhydrate im Muskel. Wenn man sich diese Auffassung von der sofortigen Verwendung der frei gewordenen Phosphorsäure zu eigen macht, so gewinnt die Hexosephosphorsäure die Bedeutung eines Zwischenproduktes beim Abbau der Kohlenhydrate im Muskel. Die Phosphorsäure wird zu dem Vehikel, das immer neue Mengen von Kohlenhydrat dem Abbau zuführt[3]). Bei ergostatisch gemessener Muskelleistung von kräftigen Männern stellte es sich heraus, daß dieselben bei Verabreichung eines phosphorsäurehaltigen Trankes wesentlich erhöht wurde. Die Versuche wurden nachher bei Marschleistungen von Soldaten auf ganze Regimenter erweitert, und sie erwiesen stets die entscheidende Rolle der Phosphate bei der Erhöhung der Leistungsfähigkeit[4]). Der Ausgangspunkt dieser Versuche war die Annahme, daß die Lactacidogensynthese bei der Verabreichung von Phosphaten erhöht wird und daher mittelbar auch die Leistungsfähigkeit des Muskels begünstigt wird.

Die Säuren — Milchsäure und Phosphorsäure — sollten so bei der Muskelstarre wie auch bei der Kontraktion eine wichtige Rolle spielen. Es wird angenommen, daß zur Erzeugung der Muskelkontraktion die physikalisch-chemische Einwirkung der frei werdenden Säuren — Milch- und Phosphorsäure — benutzt wird. Nach *Fürth* und *Lenk* besteht die Muskelstarre in einer Quellung der Fibrillen, hervorgerufen durch entstandene Milchsäure, Gerinnung der Muskelkolloide löst die Starre. Daß auch die normale Muskelkontraktion die Folge der Entstehung von Milchsäure ist, die Erschlaffung die Folge ihrer Verbrennung, wurde von *Pauli*[5]) wahrscheinlich gemacht.

---

[1]) *G. Embden*, Med. Klinik **19**, 732, 1919.

[2]) *Embden*, H. **118**; zitiert nach *Schmitz*, Klin. Wochenschr. **1**, 432, 1922.

[3]) *Schmitz*, Klin. Wochenschr. **1**, 432, 1922.

[4]) *Embden*, Med. Klinik **19**, S. 738, 1919.

[5]) Zitiert nach *H. H. Meyer* und *Gottlieb*, Experimentelle Pharmakologie **4**, 485, 1919.

Es schien daher interessant, nachzuprüfen, ob die menschlichen Organe bzw. das von menschlichen Organen hergestellte Organpulver[1]) einen Fructosediphosphorsäureester auf enzymatischem Wege spalten können oder nicht. Durch den Nachweis der Anwesenheit eines solchen Ferments in zahlreichen Organen wäre mindestens jene Bedingung geklärt, daß im Menschenorganismus ein Enzym vorhanden ist, welches eine beim pflanzlichen Zuckerabbau fakultative intermediäre Form des Kohlenhydratmoleküls, das in den meisten tierischen Organen vorkommt, zerlegt. Hiernach wäre ein im Pflanzenreich verbreitetes Enzym auch in dem tierischen Organismus vertreten, und die Spaltung der Fructosediphosphorsäure scheint eine allgemeine physiologische Wichtigkeit zu haben.

Die Versuchsmethodik war dieselbe wie die bereits bei den Untersuchungen bezüglich der enzymatischen Spaltung der Glycerinphosphorsäure beschriebene. Fructosediphosphorsaures Calcium wurde mit Natrium oxalicum zum Natriumsalz umgewandelt.

Diese Verbindung wurde durch die Gefälligkeit des Herrn Prof. *Neuberg* dem Herrn Prof. *Bodnár* überlassen, von dem ich sie erhielt; es sei gestattet, für die liebenswürdige Überlassung meinen besten Dank auch hier auszusprechen. Es wurden stets 0,5 g Organpulver in 100 ccm der Lösung bei 37° C untersucht. Die Proben wurden 48 Stunden im Thermostaten gelassen. Die Untersuchungen — und zwar die Bestimmung der Menge der abgespaltenen Phosphorsäure — wurden in derselben Weise ausgeführt, wie dies bei den Untersuchungen bezüglich der Glycerophosphatase in menschlichen Organen bereits geschildert ist. Bei der Anstellung der Versuche wurden immer auch Fructosediphosphorsäurelösungen für sich geprüft.

Es wurden folgende Organe untersucht: Leberkrebs, Hoden, Nebennieren, Herzmuskel, Milzmetastase eines Magencarcinoms, Metastase eines Uteruskrebses am Omentum, Schilddrüse, normaler Musculus ileopsoas, Ileopsoas einer an Eklampsie gestorbenen Frau, Blutserum eines Gesunden, Blutkuchen, Amyloidniere, Milz, Leber, Fibromyoma uteri und Darm. Die Versuchsergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle derart geordnet, daß die Mengen des $Mg_2P_2O_7$ die Mittelwerte je zweier Proben, daher insgesamt vier parallele Untersuchungen bedeuten. Die Numerierung der Organe ist dieselbe wie bei den bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Glycerophosphatase, dortselbst befinden sich auch die histologischen Befunde. Bezüglich der Spaltungsprozente sei bemerkt, daß es sich um die Prozente der abspaltbaren Phosphorsäure handelt, da jedoch an das Fructosemolekül zwei Phosphorsäuregruppen angelagert sind, bleibt es natürlicherweise

[1]) *E. Forrai*, diese Zeitschr. **142**, 282, 1923.

fraglich, inwiefern es zu einer vollständigen Spaltung zu Fructose und anorganischer Phosphorsäure kam.

Nr. d. Organs	Untersuchtes Organ	Zur Bestimmung angewandte Menge	$Mg_2P_2O_7$ a aktiv	$Mg_2P_2O_7$ c Autolyse	Unterschied a — c umgerechnet auf 100	Zersetzte Fructosediphosphorsäure Proz.
2	Leberkrebs	20	0,0271 0,0279	0,0040	0,1175	44,27
3	Hoden	20	0,0345 0,0348	0,0060	0,1430	55,14
4	Nebenniere	20	0,0209 0,0202	0,0030	0,0975	37,60
5	Herzmuskel	20	0,0218 0,0186	0,0054	0,0740	28,53
6	Milzmetastase eines Magenkrebses	20	0,0405 0,0397	0,0073	0,1645	63,43
7	Metastase eines Gebärmutterkrebses	20	0,0286 0,0279	0,0043	0,1200	46,27
8	Schilddrüse	20	0,0377 0,0365	0,0027	0,1720	66,52
9	Muskel (Ileopsoas) normal	20	0,0142 0,0145	0,0045	0,0490	18,89
10	Muskel (Ileopsoas) Eklampsie	20	0,0323 0,0341	0,0058	0,1370	52,82
11	Blutserum	20	0,0093 0,0089	0,0039	0,0260	10,03
15	Amyloidniere	20	0,0324 0,0342	0,0041	0,1460	56,29
16	Milz	20	0,0349 0,0346	0,0070	0,1385	53,40
17	Leber	20	0,0347 0,0345	0,0047	0,1495	58,46
18	Fibromyom der Gebärmutter	20	0,0209 0,0202	0,0030	0,0875	34,53
19	Darm	20	0,0271 0,0277	0,0076	0,0990	38,17
21	Blutkuchen	20	0,0241 0,0232	0,0055	0,0910	35,09

Die Versuchsresultate zeigen ausnahmslos eine Spaltung. Der menschliche Organismus hat daher die Fähigkeit — mindestens in den untersuchten Organen — eine fakultative intermediäre Form des Kohlenhydratmoleküls der Hefegärung, welches mit der „Kontraktionssubstanz" der Muskulatur nahezu identisch ist, enzymatisch zu spalten. Durch das Vorhandensein dieses Enzyms ist mindestens die Möglichkeit der enzymatischen Spaltung im tierischen Organismus für die erste Stufe auf einem Wege des pflanzlichen Zuckerabbaues vorhanden.

Die größte Spaltung zeigte die Schilddrüse (66,5 Proz.), die kleinste der gesunde Muskel (18,89 Proz.). Eine ziemlich große Differenz ist

zugunsten des Psoas von einem Falle von Eklampsie im Vergleich zum Gesunden zu beobachten. Eine geringere Spaltung zeigt ein hepatocellulärer Leberkrebs im Verhältnis zur gesunden Leber.

Ein ubiquitäres Dasein des Ferments — mindestens in den untersuchten Organen — mußte bei einer morphologischen Denkungsart zu dem Gedanken führen, welche jener morphologischen Elemente es seien, die in sämtlichen spaltenden Geweben gemeinsam wären. Die untersuchte Organenreihe enthält Organe von ganz verschiedener Herkunft, deren morphologische gemeinsame Teile nur die darin befindlichen mesenchymalen Elemente und das Blut waren; da aber jedes Organ eine Spaltung zeigte, konnte daran gedacht werden, *daß ein in jedem Falle beobachtetes Spaltungsminimum sich in den morphologisch gemeinsamen Teilen lokalisiert*. Das Spaltungsvermögen konnte daher so aufgefaßt werden, als wenn es sich aus zwei Komponenten zusammenstellte; die eine lieferte das stabile, in jedem Organ befindliche, gemeinsame spaltende Element — die andere wäre das Spezifische für jedes Organ. Das erstere wäre — dementsprechend das Blut oder das Mesenchym — eventuell beide zusammen. Das Blut bzw. der Blutkuchen zeigte tatsächlich eine Spaltung von 35,09 Proz. Das zeigt auch, daß eventuelle quantitative Differenzen im Spaltungsvermögen der einzelnen Organe nicht allzu hoch geschätzt werden dürfen, da doch die Blutfüllung eine verschiedene gewesen sein kann. Das Spezifische für die einzelnen Organe könnte nur mit entbluteten und durchgewaschenen Tierorganen ermittelt werden. Immerhin zeigen die einzelnen Organpulver so erhebliche Spaltungsdifferenzen, daß dieselben sich aus den Unterschieden der Blutfüllung nicht erklären lassen. Da die spezifischen Eigenschaften der menschlichen Fructosediphosphatase nicht bekannt sind, ist es möglich, daß die stark spaltenden Organe dem Enzym die optimalen Bedingungen bieten.

Zusammenfassung.

Menschliche Organpulver wurden untersucht, ob dieselben den Fructosediphosphorsäureester enzymatisch in vitro spalten.

Es wurde nachgewiesen, daß eine Reihe von menschlichen Organen das fructosediphosphorsaure Natrium enzymatisch spaltet. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede im Spaltungsvermögen der einzelnen Organe. Kleinere Differenzen des Spaltungsvermögens können nicht gehörig gewertet werden, da auch das Blut bzw. der Blutkuchen eine Spaltung zeigt und Differenzen der Blutfüllung in den einzelnen Organen sicherlich vorhanden waren.

Differenzierung menschlicher Phosphatasen.

Von

Elemér Forrai.

(Aus dem königl. ungarischen pflanzenbiochemischen Institute Budapest und aus dem chemischen Institute der Universität Szeged.)

(Eingegangen am 13. Dezember 1923.)

Die Phosphatasen, welche von den organischen Phosphorsäureverbindungen anorganische Phosphorsäure abspalten, kommen sowohl im pflanzlichen wie auch im tierischen und menschlichen Organismus vor und dürften im Stoffwechsel der Lebewesen eine vielleicht noch bei weitem nicht gehörig gewürdigte Rolle spielen. Die Literatur findet sich in meiner vorstehenden Mitteilung über Fructosediphosphatase sowie in Mitteilungen über Glycerophosphatase und Saccharosephosphatase in menschlichen Organen vor[1]).

Es wurde — wie bereits veröffentlicht — Glycerophosphatase, Fructosediphosphatase und Saccharophosphatase in den menschlichen Organen gefunden. Es sei kurz bemerkt, daß die von den genannten Enzymen gespaltenen Ester eine wichtige biologische Rolle spielen. Die Glycerinphosphorsäure ist ein Spaltprodukt der biologisch so wichtigen Lipoide. Die Fructosediphosphorsäure spielt bei der Hefegärung eine wahrscheinlich äußerst wichtige Rolle und dürfte auch im tierischen sowie menschlichen Kohlenhydratabbau ein entscheidender Faktor sein. Ihre Rolle wurde in der Form des Lactacidogens von *Embden* und seinen Mitarbeitern geklärt. Sie würde nach *Schmitz* ein Vehikulum sein, welches der Spaltung stets neue Kohlenhydratmengen zuführt. Der dritte Ester, die Saccharosephosphorsäure, kommt dagegen im Organismus nicht vor und ist als Naturprodukt nicht bekannt. Es war nun die Frage, ob die Enzyme, welche diese Ester zerlegen, dieselben sind oder voneinander verschiedene Fermente. Was die chemische Struktur dieser Ester betrifft, so ist die Phosphorsäure in denselben auf gleiche Weise verestert, und die enzymatische Spaltung könnte geradeso durch eine gemeinsame Esterase besorgt werden wie durch spezifische Enzyme.

---

[1]) *E. Forrai,* diese Zeitschr. **142**, 281, 1923.

Es sollen nun auf Grund meiner Untersuchungen über Glycero-, Fructosedi- und Saccharosephosphatase der menschlichen Organe die Versuchsergebnisse verglichen werden, da es aus diesen ersichtlich ist, daß die genannten Phosphatasen voneinander verschiedene Enzyme sind.

Die Versuchsergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle derart zusammengestellt, daß die abgespaltene Phosphorsäure in Prozentzahlen der abspaltbaren Phosphorsäure verzeichnet ist.

Nr. des Organs	Untersuchtes Organ	Zersetzte Glycerinphosphorsäure Proz.	Zersetzte Fructosediphosphorsäure Proz.	Zersetzte Saccharosephosphorsäure Proz.
1	Niere	42,8	nicht untersucht	—
2	Leberkrebs	29,18	44,27	22,94
3	Hoden	9,34	55,18	—
4	Nebennieren	18,2	37,60	18,92
5	Herzmuskel	—	28,53	—
6	Milzmetastase eines Magenkrebses	16,66	63,43	16,81
7	Metastase eines Gebärmutterkrebses	14,01	46,27	7,98
8	Schilddrüse	13,72	66,52	—
9	Muskel (normal)	—	18,89	—
10	Muskeleklampsie	5,49	52,82	—
11	Blutserum (normal)	—	10,03	—
13	Pancreas	6,81	nicht untersucht	13,44
15	Amyloidniere	22,19	56,29	nicht untersucht
16	Milz	3,89	53,40	
17	Leber	12,27	58,46	
18	Fibrimyom der Gebärmutter	4,09	34,53	
19	Darm	74,54	38,17	

Es ist aus der Tabelle ersichtlich, wie bereits betont, daß die Glycerinphosphorsäure durch die Organe epithelialer Natur enzymatisch zerlegt wird, während dieselbe von den Organen des Mesenchyms nicht angegriffen wird. Die Fructosediphosphorsäure wird vom Blute zersetzt und scheint auch außerdem von sämtlichen untersuchten Organen gespalten zu werden, da die abgespaltene Menge der anorganischen Phosphorsäure die Menge, welche vom in den Organpulvern anwesenden Blute abgespalten werden könnte, überschreitet. Die Saccharosephosphorsäure wird von den Organpulvern am wenigsten angegriffen. Es zeigen nur die karzinomatösen Organe, außerdem Nebenniere und Pankreas eine Spaltung, so daß es sich um dasselbe Enzym, welches die Fructosediphosphorsäure spaltet, nicht handeln kann. Die Saccharosephosphorsäure wird zwar ähnlich der Glycerinphosphorsäure von keinem mesenchymalen Organ zerlegt — jedoch von der Niere z. B., welche von der Glycerinphosphorsäure 42,8 Proz. abspaltet, nicht angegriffen —, desgleichen auch von der Schilddrüse. Es wären daher die menschliche Saccharophosphatase, die menschliche Glycerophospha-

tase und Fructosediphosphatase voneinander verschiedene Enzyme. Die *eine* Bedingung der enzymatischen Verarbeitung der genannten Ester, das Vorhandensein des Enzyms, wäre daher in verschiedenen Organen des Menschen gegeben. Sollte eine enzymatische Spaltung dieser Ester im Organismus des Menschen stattfinden — was bei einem Spaltprodukte der Lipoide, wie die Glycerinphosphorsäure, oder einem eventuellen Kohlenhydratabbauprodukt, wie die Fructosediphosphorsäure, sogar wahrscheinlich ist —, so kann dieselbe bei der Glycerinphosphorsäure in den epithelialen Organen bei der Fructosediphosphorsäure in den meisten Organen — auch im Blute — zustande kommen. Die enzymatische Verarbeitung dieser beiden Ester muß daher mindestens teilweise gesondert vor sich gehen.

Zusammenfassung.

Die menschliche Saccharosephosphatase, Fructosediphosphatase und Glycerophosphatase sind voneinander verschiedene spezifische Enzyme. Die Spaltung der genannten Ester wird nicht durch eine gemeinsame Esterase besorgt.

Über
den osmotischen Druck einiger hochmolekularer Elektrolyte.

Von

Erik Jorpes und E. G. Hellgren.

(Aus der physiologisch-chemischen Abteilung des Karolinischen Instituts zu Stockholm.)

(Eingegangen am 19. November 1923.)

Das Natriumsalz der Benzidin-tetrazo-dinaphthylamin-di-sulfonsäure, Kongorot, gibt nach *Biltz* und *Vegesack*[1]), *Bayliss*[2]), *Donnan* und *Harris*[3]) einen direkt gegen Wasser gemessenen osmotischen Druck, der nur so hoch ist wie der für den undissoziierten Zustand berechnete, obgleich die Dissoziation in verdünnten Lösungen eine fast vollständige ist. Ähnliche, aber kleinere Abweichungen von dem erwarteten Druck hat auch *Biltz* für andere Farbstoffe gefunden. Die genannten Autoren deuten indessen das Phänomen als eine Aggregation, die eben die Dissoziation aufhebt, eine Erklärung, die, wie äußerst unwahrscheinlich sie auch lautet, von *Höber* in seinem Lehrbuch[4]) aufgenommen wird. *Donnan* meint, daß der Grund zu dem abnormen Drucke eher als ein Membranphänomen in irgend einer unerklärten Weise zu denken sei. *E.* und *H. Hammarsten* haben nun gezeigt[5]), daß diese Deutungen unrichtig sind, indem bei gewissen Elektrolyten, wie Thymonucleinsäure, Protaminchlorid, Histonchlorid, wo die Wasserstoff- und Chlorionenkonzentrationen direkt elektrometrisch gemessen wurden, die gefundenen osmotischen Drucke in der Tat durchgehend erheblich kleiner waren als die für nur die gemessenen Ionenkonzentrationen berechneten. Da diese Elektrolyte auch bei Messungen vom elektrischen Leitvermögen

---

[1]) *W. Biltz* (mit *v. Vegesack*), Zeitschr. f. physikal. Chem. **68**, 357, 1909; **73**, 481, 1910; *W. Biltz*, ebendaselbst 77, 91, 1911.

[2]) *W. M. Bayliss*, Proc. Roy. Soc., Ser. B, 81, 269, 1909.

[3]) *F. G. Donnan* und *Harris*, Transact. of the Chem. Soc. **99**, 1554, 1911.

[4]) Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 1914, S. 268.

[5]) Arch. för Kemi, Mineralogi och Geologi; Kungl. Svenska Vetensk. Akad. 8, 27.

sich als fast vollständig dissoziiert zeigten, konnte eine Aggregation in keiner Weise die zu niedrigen Drucke erklären. Gefrierpunktsmessungen gaben innerhalb der Fehlergrenzen gute Übereinstimmung mit den manometrischen Druckmessungen. *Donnans* Erklärung für den abnormen Druck als ein Membranphänomen ist also hinfällig. *H. Hammarsten* zeigte weiter, daß der abnorme Druck erst bei relativ großen Molekülen auftrat. Das Natriumsalz der Guanylsäure hatte den normalen, nach dem Dissoziationsgrad berechneten osmotischen Druck und ein Volumen des ganzen Moleküls in Wasserlösung von 197 ccm, während Glykocholsäure, Taurocholsäure und Thymonucleinsäure samt ihren Natriumsalzen mit steigenden Molekülvolumina immer größere Abweichungen im Sinne eines zu niedrigen Druckes zeigten. Da Elektrolyte mit hohem Molekülgewicht aber relativ kleinem Molekülvolumen, wie Metawolframsäure, einen normalen osmotischen Druck haben, lag es nahe anzunehmen, daß die gefundenen Abweichungen mit den großen Molekülvolumina in Zusammenhang standen. In Betracht des großen Interesses der Resultate sowohl aus theoretischem wie aus praktisch biologischem Gesichtspunkte war es wünschenswert, die Versuche zu vervollständigen und auch die Resultate von *Biltz*, *Bayliss* und *Donnan* zu kontrollieren. Kongorot hat ein Molekülvolumen, das verhältnismäßig klein ist, und es war deshalb zu erwarten, daß die Abweichung von *van 't Hoffs* Gesetz nicht so groß sein konnte, wie die von den genannten Autoren gefundenen. Es war auch wünschenswert, die Versuchsbedingungen so zu wählen, daß die Abweichungen im osmotischen Druck der zu prüfenden Verbindungen nicht etwa durch wesentliche Verschiedenheiten in der Struktur kompliziert werden konnten. Wir haben deshalb auf Vorschlag von *E. Hammarsten* eine Reihe von Salzen der Kongosäure mit den homologen aliphatischen Aminen untersucht. Gleichzeitig haben wir auch die Natrium- und Ammoniumsalze geprüft. Es war nach den Resultaten von *E.* und *H. Hammarsten* zu erwarten, daß der osmotische Druck mit steigenden Molekülvolumina der Amine größer werden mußte. Wenn die Betrachtungsweise zuläßlich ist, daß bei Verbindungen von großen Ionen mit kleineren, wie Na^+, H^+ und ^-Cl, diese in das Planetsystem der großen Ionen einbezogen werden und dadurch eben wie die einzelnen Atomkomplexe im großen Ion nicht mehr osmotisch als selbständige Massen wirken, so müßte diese „Verbergung“ von kleineren Ionen mit steigenden Volumina derselben unvollständiger werden. Unsere Resultate stehen unzweideutig in Übereinstimmung mit dieser Hypothese.

Die osmotischen Drucke wurden, wo dies möglich war, direkt mit der Steighöhenmethode gemessen. Bei den Verbindungen mit Triäthyl- und Tripropylamin versagte leider diese Methode, indem Fällungen in der Innenflüssigkeit auftraten. Da weder solche Fällungen noch ultra-

mikroskopische Aggregation durch die Dialysewirkung bei den Natrium-, Ammonium- oder Trimethylaminverbindungen auftraten, sind wir nicht imstande, das Verhalten der Triäthyl- und Tripropylsalze zu erklären. Vielleicht könnte der Umstand verantwortlich sein, daß für die Steighöhenmessungen mit diesen Salzen eine ziemlich alte Kongoblaulösung zur Verwendung kam.

Die Gefrierpunktsmessungen wurden mit einer Genauigkeit von $\pm 0{,}001$ bis $0{,}002^0$ gemacht, und die Werte sind ja demgemäß nur auf ± 18 cm Wasserdruck genau. Bei unseren Versuchsbedingungen würde dies bis höchstens ± 10 Proz. Unsicherheit bedeuten.

Experimentelles.

25 g Kongorot (von *Kahlbaum* bezogen) wurden in 700 ccm Wasser gelöst, mit einem Überschuß an Salzsäure versetzt und die Lösung mit der entstandenen Fällung von Kongoblau in zwei große Kollodiumhülsen gebracht. Diese steckten in Wasser von 40^0, das jeden Tag in 3 Wochen erneuert wurde. Nach dieser Zeit gaben 300 ccm der Außenflüssigkeit nach Eindampfen keine Reaktion auf Sulfat- oder Chlorionen. Die Innenflüssigkeiten wurden dann in einen Jenakolben gebracht und zum Kochen erhitzt. Der Kolben wurde mittels eines Gummistopfens mit Heber und Natronkalkrohr montiert, verschlossen und die Lösung so aufbewahrt. Diese Stammlösung diente zur Herstellung der Salze mit Natrium und den Aminen. Der Gehalt an Kongoblau wurde durch Wägung nach Eindampfen und Trocknen zum konstanten Gewicht bei 120^0 im Vakuum zu 3,46 g auf 100 ccm (= 0,0531 mol.) bestimmt.

Die Analyse auf Schwefelsäure gab folgende Werte:

Substanz der freien Säure g	$BaSO_4$ g	H_2SO_4 gefunden Proz.	H_2SO_4 berechnet Proz.
2,0872	1,3553	27,3	—
1,7811	1,1423	26,95	—
	Mitttel . .	27,13	30,00

0,2468 g der freien Säure gaben nach Verbrennung keinen wägbaren Rückstand.

Im Kardioidultramikroskop zeigte die Lösung grüne Farbe und eine unzählbare Masse lebhaft beweglicher Partikeln.

Die verschiedenen Salze wurden durch Zusatz von genau den berechneten Mengen der kohlensäurefreien Basenlösungen, ohne daß die Lösungen auch nur für einen Augenblick mit kohlensäurehaltiger Luft in Berührung kamen, bereitet. Auch die Überführung in die

Kollodiumhülsen bei den osmotischen Messungen geschah in einem durch Natronkalkröhre abgeschlossenen System. Die Verdünnungen der Salzstammlösungen wurden in den Kollodiumhülsen mit kohlensäurefreiem Wasser gemacht.

Zu den Gefrierpunktsmessungen wurden die Salzstammlösungen verwendet. Die Konzentrationen in den Steighöhenversuchen wurden durch Wägung bestimmt nach Eindampfen mit einem genau abgemessenen Überschuß an Natronlauge, Zusatz der äquivalenten Menge Salzsäure und Korrektion für das Gewicht des gebildeten Kochsalzes. Dieses Gewicht wurde in Parallelversuchen ohne Kongoverbindung besonders ermittelt. Die Konzentrationen des Natriumsalzes der Kongosäure wurden direkt durch Wägung nach Eindampfen bestimmt.

Um die Hydrolyse in den osmotischen Versuchen möglichst zurückzuhalten, wurden als Außenflüssigkeiten verdünnte Lösungen der entsprechenden freien Basen verwendet. Die Außenflüssigkeiten wurden alle 12 Stunden durch immer schwächere Basenlösungen vertauscht, wobei die zwei letzten aus kohlensäurefreiem Wasser bestanden. Es zeigte sich in Versuchen mit Trimethylamin, daß eine n/1000 Lösung dieser Base in weniger als 10 Stunden in einer der gebrauchten Kollodiumhülsen gegen 200 ccm Wasser einen osmotischen Druck 0 gab. Da weiter die elektrometrischen Wasserstoffionenmessungen in den Innenflüssigkeiten in allen Versuchen schwach saure Reaktion (p_H etwa 6) gaben, und die Steigkurven während 6 bis 10 Stunden unveränderliche Maximalwerte zeigten, war es erwiesen, daß wir in unseren Versuchen osmotisches Gleichgewicht erreicht hatten. Die ultramikroskopische Untersuchung der Innenflüssigkeiten (ohne Verdünnung) zeigte nur vereinzelte bewegliche Partikeln in jedem Gesichtsfelde. Sämtliche Außenflüssigkeiten waren in allen Versuchen völlig ungefärbt.

Die Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt worden.

In Kolumne 10 und 11 sind die Verhältnisse zwischen den gefundenen und den für den undissoziierten Zustand berechneten Drucken angegeben. Für das Natriumsalz fanden *Bayliss* und *Donnan* dies Verhältnis = 0,90 bis 0,97, während unsere Bestimmungen unzweifelhaft zeigten, daß ein Teil der Natriumionen osmotisch wirksam war. Versuche mit dem Ammoniumsalz ergaben auffälligerweise das Verhältnis = 1,00, während man höhere Werte zu erwarten hatte, weil H_4N größer als Na ist. *E. Hammarsten* hat auch für das Ammoniumsalz der Thymonucleinsäure das Verhältnis 1,20 bis 1,32 gefunden und für das Natriumsalz 0,80. Das Ammoniumsalz der Kongosäure war nun nicht aus derselben Kongoblaulösung wie die übrigen Salze dargestellt, sondern durch Dialyse des unreinen Ammoniumsalzes bereitet. Die zu den Bestimmungen benutzte Stammlösung des Ammoniumsalzes gab bei elektrometrischen C_{Cl}-Messungen eine C_{Cl} von 0,000685 n.

Tabelle I.

Untersuchtes Kongosalz	Molare Konzentration: der Stammlösungen und der Innenflüssigkeit i. n Gleichgew., als undissoziiertes Salz berechnet C	Molare Konzentration: der Basen in den Außenflüssigkeiten als undissoziiert berechnet	p_H der Stammlösungen und der Innenflüssigkeiten im Gleichgew.	Molare Leitfähigkeit	Gefrierpunkt: gefunden Δ_i °C	Gefrierpunkt: berechnet für C Δ_I °C	Osmotischer Druck in ccm Wasser: gefunden P_i	Osmotischer Druck in ccm Wasser: berechnet für C P_I	$\frac{\Delta_i}{\Delta_I}$	$\frac{P_i}{P_I}$
Diammoniumsalz	0,004 3	0,000 055	5,8	—	—	—	108,2	105,3	—	1,027
	0,004 53	0,000 055	6,4	—	—	—	107,1	110,9	—	0,965
	0,003 7	0,000 051	—	—	—	—	88,9	90,7	—	0,98
	0,003 37	0,000 077	5,7	—	—	—	83 9	81,98	—	1,023
							Mittel . .		—	0,999
Dinatriumsalz	0,013 35	—	—	—	—0,03	—0,0252	—	—	1,19	—
	0,002 9	0,000 031	6,5	194,8	—	—	87,9	71,2	—	1,23
	0,003 6	0,000 026	6,4	—	—	—	107,8	88,7	—	1,22
	0,004 7	0,000 05	6,3	—	—	—	133,7	115,5	—	1,157
							Mittel . .		1,19	1,20
Ditrimethylaminsalz	0,035 8	—	6,0	73,5	—0,084	—0,68	—	—	1,235	—
	0,017 9	—	6,3	—	—0,042	—0,34	—	—	1,235	—
	0,002	0,000 035	5,4	145	—	—	66,7	48,4	—	1,38
	0,003 07	0,000 053	5,1	130	—	—	93,7	75,4	—	1,24
	0,004 15	0,000 03	6,5	—	—	—	118,1	102,1	—	1,16
							Mittel . .		1,24	1,26
Ditriäthylaminsalz	0,006	—	5,4	97	—0,0207	—0,0113	—	—	1,831	—
	0,005 45	—	6,2	—	—0,0188	—0,0103	—	—	1,825	—
							Mittel . .		1,83	—
Ditripropylaminsalz	0,006,79	—	6,9	—	—0,031	—0,0128	—	—	2,42	—
	0,005,09	—	6,3	—	—0,03	—0,0096	—	—	3,12	—
	0,005,43	—	6,5	—	—0,033	—0,0104	—	—	3,17	—
							Mittel . .		2,91	—

Vielleicht waren auch andere Salze da, und sowohl die dadurch bedingte scheinbar höhere, gefundene Konzentration wie auch ein allerdings sehr kleiner Donnaneffekt müßten das Verhältnis, Kolumne 11, niederdrücken. Die Verhältnisse, Kolumnen 10 und 11, für die Aminsalze zeigen einwandfrei das Ansteigen des osmotischen Druckes mit wachsenden Molekülvolumina der Amine. Die Volumina der drei Amine müssen sich wie 1 : 2 : 3 verhalten. Es ist aber nicht möglich zu sagen, ob die Steigerungen im Druck gegen die Molekülvolumina proportioniert waren. Die Gefrierpunktsbestimmungen am Tripropylaminsalz variierten nämlich erheblich. Der Wert 2,42 würde sehr gut mit voller Proportionalität stimmen und ist wahrscheinlich der richtigere, da das Verhältnis 3,00 vollständige Dissoziation voraussetzt. Vorläufig kann also die mathematische Abhängigkeit zwischen Molekülvolumina und dem osmotischen Druck nicht sicher definiert werden. Daß aber eine solche Abhängigkeit bei gewissen Größenverhältnissen der Ionen existiert, darüber kann kein Zweifel mehr herrschen.

Neue Beiträge zur Frage nach der Adsorption der Eiweißabbauprodukte durch Erythrocyten.

Von

N. Griasnow.

(Aus dem mikrobiologischen Institut zu Rostow am Don.)

(Eingegangen am 28. November 1923.)

In seiner Arbeit[1]) hat *Sbarsky* Beweise für die Adsorption der Eiweißabbauprodukte durch Erythrocyten des Blutes angeführt; da er aber nur chemisch gearbeitet hat, bleibt die Frage unentschieden, ob dabei auch etwa Toxine (*Sbarsky* arbeitete mit Diphtherietoxin) oder lediglich die Abbauprodukte allein adsorbiert wurden.

Daher sind auf unseren Vorschlag im bakteriologischen Institut zu Rostow am Don von Fräulein Dr. *Ermilowa* biologische Versuche über Adsorption des Diphtherietoxins durch das Blut mittels nachfolgend beschriebener Methodik angestellt worden.

Zu 1 ccm Oxalatblut wurde eine Diphtherietoxin-dose hinzugefügt, die bei intramuskulärer Applikation bei einer Taube ein Ödem hervorbringt. Die Dose unseres Toxins beträgt 0,035 (0,03 bewirkt noch kein Ödem). Die Gesamtmenge der Flüssigkeit belief sich auf 7 ccm. Es wurden Versuche am Menschen-, Pferde-, Hammel-, Kaninchen- und Meerschweinchenblut ausgeführt. Das Gemisch wurde 1 bis 2 Stunden bei 37° im Brutschrank gehalten, darauf wurden die Formelemente abzentrifugiert und die Flüssigkeit in den Pectoralmuskel einer Taube, die Erythrocyten aber einer anderen Taube eingespritzt.

Tabelle I.

	Gewicht	Eingespritzt	Nach 24 Std.	Nach 48 Std.	Nach 72 Std.
Taube 1 . . .	270	Flüssigkeit	Groß. Ödem	>	+
Taube 2 . . .	263	Erythrocyten	Kein Ödem	—	—
Kontrolltaube	272	0,035 Diphtherietoxin in 6 ccm phys. Kochsalzlösung	Groß. Ödem	>	+
Kontrolltaube	269	0,03 Diphtherietoxin in 6 ccm phys. Kochsalzlösung	Kein Ödem	—	—

[1]) Diese Zeitschr. 135.

Nach dreimal 24 Stunden ging sowohl die Taube, welche den flüssigen Teil des Zentrifugats erhalten hatte, als auch die Kontrolltaube (mit 0,035 Diphtherietoxin) ein, während es bei der Taube, welcher Erythrocyten beigebracht waren, nicht einmal zum Ödem kam. Es ist somit der Schluß zu ziehen, daß das Toxin im Serum zurückblieb, nicht aber von den Erythrocyten adsorbiert wurde. Nach der erwähnten Methode wurden sieben Versuche mit gleichem Erfolge angestellt.

Es liegt daher die Vermutung nahe, daß in den Versuchen von *Sbarsky* aus der Toxinmischung von den Erythrocyten nur die Eiweißabbauprodukte adsorbiert werden. Wäre das der Fall, so könnten in der Lösung die Eiweißabbauprodukte durch Erythrocyten, etwa wie der hämolytische Zwischenkörper, fixiert werden. Um diese Erscheinung (einigermaßen) zu veranschaulichen, wurde folgender Versuch angestellt:

In ein Reagenzglas wurden zu 6 ccm Blut 1 ccm Toxin und 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung, in ein anderes 6 ccm Blut, 1 ccm Toxin und 3 ccm destillierten Wassers gebracht, um eine teilweise Hämolyse zu erzielen.

Beide Reagenzgläser wurden $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° zum Zwecke der Fixierung der Eiweißabbauprodukte durch Erythrocyten im Brutschrank gehalten. Ab und zu wurden die Reagenzgläser geschüttelt. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde wurden die Erythrocyten abzentrifugiert und der flüssige Teil aus jedem Reagenzglas abpipettiert. Zum Versuch dienten je 4 ccm dieser Flüssigkeiten, welche je 0,4 Toxin entsprachen. Zur Kontrolle dienten 0,4 Toxin. Die dabei entstandene Nitritmenge wurde mittels des *Ilosvay-Lunge*schen Reagens im Kolorimeter von *Dubosq* bestimmt.

Tabelle II.

Zur Reaktion angewandt	Toxingehalt	Erhaltene Nitritmengen
Toxin nach Entfernung der Erythrocyten ohne Hämolyse	0,4	0,0034
Toxin nach Entfernung der Erythrocyten bei teilweiser Hämolyse	0,4	—
Kontrolle (Diphtherietoxin)	0,4	0,00295

Mehrfach mit gleichem Erfolge angewandte Versuche zeigen, daß die Erythrocyten nicht imstande sind, aus der Toxinlösung aktive Stoffe bei der *Bach*schen Reaktion zu binden. 0,4 Toxin, nach $\frac{1}{2}$stündigem Verbleiben im Brutschrank bei 37° von den Erythrocyten befreit (abpipettiert), ergaben eine größere Menge N_2O_3 als 0,4 Toxin im Kontrollversuch. Im anderen Reagenzglase dagegen, in dem infolge der Hämolyse weniger Erythrocyten enthalten waren, der Versuch jedoch in Gegenwart von Oxyhämoglobin angestellt war, wurde kein N_2O_3 festgestellt, es sei denn, daß es von Oxyhämoglobin oxydiert wurde.

Um sich eine Vorstellung über den Grad dieser Oxydationsvorgänge des Nitrits durch Blut zu verschaffen, wurde folgender Versuch ausgeführt:

Vier Reagenzgläser wurden mit je 3 ccm Erythrocyten beschickt und steigende Mengen (0,01, 0,02, 0,03 und 0,04) des Nitrits hinzugefügt.

Die Reagenzgläser wurden ½ Stunde in ein Dampfbad von 60° gestellt, darauf wurde im Filtrat jeder Probe die Nitritmenge kolorimetrisch mit dem *Ilosvay-Lunge*schen Reagens im Kolorimeter von *Dubosq* bestimmt und somit der Verlust an Nitrit berechnet.

Menge des zum Versuch angewandten Nitrits in Centimilligrammen	Verlust des Nitrits in Centimilligrammen
1	0,9962
2	1,883
3	2,987
4	3,41

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Verbrauch von Nitrit infolge der Oxydation durch Oxyhämoglobin ungefähr demjenigen von *Sbarsky* in seinen Versuchen entspricht; er ist von ihm aber als Adsorption der Eiweißabbauprodukte gedeutet worden.

Zur Bestimmung von freiem und gebundenem Pepsin im Mageninhalt.

Von

Rich. Ege.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 15. Dezember 1923.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Es ist bekannt, daß eine Reihe von Stoffen, Blutkohle, Kaolin, Tonerde usw. in sehr hohem Grade Enzyme zu adsorbieren vermögen, wie es auch eine sehr verbreitete Ansicht ist, daß das erste Stadium des enzymatischen Prozesses eine Adsorptionsverbindung zwischen dem Enzym und dem Substrat darstellt (*Bayliss*).

Trotz des sehr großen theoretischen Interesses, welches Untersuchungen über die Adsorptionsverhältnisse der Enzyme somit darbieten dürften, sind diese Verhältnisse noch wenig geklärt.

Es nimmt daher auch nicht wunder, daß die Frage der Enzymadsorption in der medizinischen Wissenschaft nur obenhin berührt worden ist, wenn man auch behaupten muß, daß die Kenntnis der Enzymadsorption, wie dies hoffentlich aus dem Folgenden hervorgehen wird, erforderlich ist, wo es darauf ankommt, Enzymmengen in Proben zu bestimmen, in denen feste Partikeln vorkommen, an die das Enzym adsorbiert sein mag.

Man muß annehmen, daß die Frage von besonderem Interesse ist für die Bestimmung von Pepsin (eventuell Chymosin) im Mageninhalt, da es — von mehrfachen, mit der *Mett*schen Methode ausgeführten Bestimmungen abgesehen — als Regel betrachtet werden kann, daß die Pepsinbestimmungen an dem filtrierten Mageninhalt ausgeführt wurden. In dem Falle wird nur die Menge des in der Flüssigkeit gelösten Pepsins bestimmt, während die eventuell an die Partikeln adsorbierte Pepsinmenge — und diese kann in gewissen Fällen bei weitem die größere sein — sich durchaus der Bestimmung entziehen wird.

In betreff der Pepsinbestimmungsmethode verweise ich hier auf *Rich. Ege*, Eine Modifikation des *Fuld*schen Verfahrens zur Bestimmung von Pepsin in Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, **175**, **1923**.

Während über die Adsorption des Pepsins an eine Reihe von verschiedenen Substanzen eine recht beträchtliche Literatur vorliegt — zu nennen sind in erster Reihe *Jacoby*[1]), *Hedin*[2]), *Michaelis*[3]) und *Northrop*[4]) —, weiß man so gut wie nichts von der Bedeutung, welche die Adsorptionsfrage für die Pepsinbestimmung im Ventrikelinhalt haben muß. Es gibt jedoch eine Ausnahme, indem *Norgaard*[5]) in einer Untersuchung über die Pepsinmenge speziell in Probemahlzeiten ohne „freie Salzsäure" dargetan hat, welch gewaltigen Einfluß die Adsorption von Pepsin an feste Bestandteile der Probemahlzeit auf die Pepsinbestimmung ausüben kann.

Norgaard zeigte, daß, wenn man die achylische Probemahlzeit, so wie sie vorlag, filtrierte und die Pepsinmenge im Filtrat bestimmte (natürlicherweise erst nachdem man dem Filtrat eine Verdauungsversuchen angemessene Wasserstoffionenkonzentration gegeben hatte), die Pepsinmenge darin meist ganz außerordentlich gering war; dies bedeutete nicht, wie man früher angenommen hatte, daß in einer solchen Probemahlzeit kein Pepsin vorhanden sei, denn, wenn man die Probemahlzeit vor der Filtration sauer machte (oder es ganz unterließ, zu filtrieren), fand man recht deutliche Pepsinmengen. *Norgaard* schließt daraus mit Recht, daß das Pepsin, wenn bei der Probemahlzeit „freie Salzsäure" fehlt, an feste Bestandteile der Probemahlzeit gebunden sein muß und sich somit eines Nachweises entzieht, daß aber das gebundene Pepsin mit Salzsäure frei gemacht wird.

Dem klinischen Interesse gemäß werde ich mich bei der Besprechung der Adsorptionsverhältnisse des Pepsins im wesentlichen auf die Adsorption an Zwieback beschränken. Bei den meisten Versuchen benutzte ich 1 g Zwieback zu 10 ccm von äußerer Flüssigkeit, was der *Ewald*schen Probemahlzeit, so wie sie verabreicht wird, recht genau entspricht.

Norgaard meint, daß die Pepsinadsorption nur für achylische Probemahlzeiten von Bedeutung ist, indem er (ohne es jedoch zu beweisen) behauptet, daß das Pepsin nicht an Weißbrot gebunden wird, wenn die Reaktion stark sauer ist, und daß in der Tat all das Pepsin, das in der achylischen Probemahlzeit an die festen Bestandteile gebunden ist und sich deswegen der Bestimmung entzieht, befreit wird, wenn man mit der gewöhnlichen Menge (10- bis 16mal n/33 Salzsäure) verdünnt. Dies ist, wie aus dem folgenden Versuch hervorgehoben wird, nicht ganz korrekt.

Zu einer Reihe von Proben mit 1 g zerquetschten Zwiebacks in 10 ccm n/10 Salzsäure (die Reaktion ist hier $10^{-1,19}$) werden steigende (und bekannte) Mengen Pepsin gesetzt (in n/10 Salzsäure gelöst). Es wird gemischt und die Proben bleiben eine Stunde lang bei gewöhnlicher

---

[1]) *Jacoby*, diese Zeitschr. **2**, 1907.

[2]) *Hedin*, Grundzüge der physikalischen Chemie 1915.

[3]) *Michaelis*, diese Zeitschr. **10** u. **15**.

[4]) *Northrop*, The combination of enzyme and substrate. Journ. of general physiology **2**, 1919.

[5]) *Norgaard*, diese Zeitschr. **107**; C. r. de la Soc. Biol. 1920, S. 83.

Temperatur stehen, worauf filtriert wird. Bestimmt man nun die Pepsinmenge im Filtrat, so läßt sich entscheiden, ob das Weißbrot bei dieser starken sauren Reaktion Pepsin zu adsorbieren vermag.

Wie die Tabelle zeigt, findet bei dieser Reaktion sogar eine sehr bedeutende Adsorption statt.

Tabelle über die Bindung des Pepsins an Weißbrot bei $p_H = 1,19$ (etwa n/10 HCl).

Konzentration von freiem Pepsin	Pepsin gebunden pro 1 g Weißbrot	Konzentration von freiem Pepsin	Pepsin gebunden pro 1 g Weißbrot
0,0026 Proz.	0,25 mg	0,022 Proz.	8,8 mg
0,0035 „	1,0 „	0,06 „	8,9 „
0,005 „	2,5 „	0,10 „	9,0 „
0,008 „	4,3 „		

Die Adsorption ist verhältnismäßig am größten bei den sehr kleinen Pepsinkonzentrationen; wenn die Konzentration des freien Pepsins zunimmt, wird verhältnismäßig immer weniger gebunden, wenn die gebundene Menge auch an absolutem Maße zunimmt, bis das Weißbrot bei einer Konzentration des freien Pepsins von unter 0,1 Proz. ganz mit Pepsin gesättigt worden ist; was man danach noch mehr von Pepsin zusetzt, wird quantitativ frei verbleiben (s. Abb. 1). Welche Bedeutung diese Pepsinadsorption auch in saurer Flüssigkeit hat, ergibt sich am besten aus dem Umstande, daß zur Sättigung von 1 g Zwieback 9 mg Pepsin verbraucht werden; denkt man sich einen Menschen ausschließlich von Zwieback lebend, so müßte man 10 g Pepsin täglich gebrauchen, nur um die Adsorption an die festen Partikeln zu decken. Die Tragweite dieser Zahl versteht man am besten, wenn man sich erinnert, daß die gewöhnlich zu therapeutischen Zwecken eingegebene Pepsinmenge 0,2 bis 0,4 g beträgt.

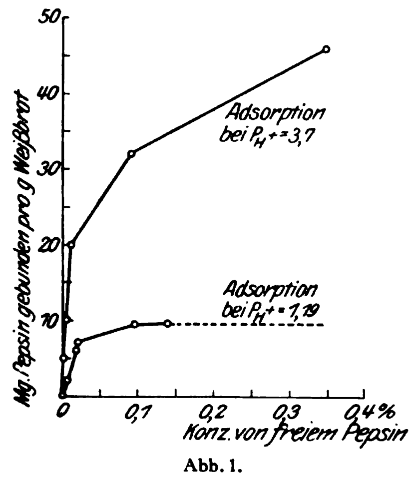


Abb. 1.

Wenn die Bindung zwischen Pepsin und Substrat eine echte Adsorption ist, muß die Bindung reversibel sein. — Es liegen in der Literatur eine Reihe von Untersuchungen vor, in denen behauptet wird, daß die Bindung zwischen dem Enzym und dem Substrat irreversibel ist; dies trifft hier jedoch nicht zu.

Wie *Nierenstein* und *Schiff*[1]) gezeigt haben, wird die Pepsinaktivität in einem filtrierten Mageninhalt (unreinem Magensaft) nicht der Verdünnung proportional sinken, bevor recht beträchtlich (1 : 15) verdünnt worden ist. Diese Forscher erklären die Erscheinung durch die Annahme, daß sich im Magensaft „hemmende Stoffe" finden, und daß deren Wirkung durch die stattgefundene Verdünnung vereitelt wird.

Es ist wahrscheinlich, daß man an der Adsorption des Pepsins eine Erklärung dieser Erscheinung besitzt; eine Reihe von Verhältnissen, über die in einer späteren Publikation zu berichten sein wird, sprechen nämlich dafür, daß eine entsprechende Pepsinbindung an gelöste kolloidale Stoffe stattfinden kann. Wenn dies zutrifft, so ist es schwer zu verstehen, daß man bei einer 16maligen Verdünnung die Wirkung der hemmenden Stoffe ganz aufheben können sollte. Die Erklärung ist sicherlich, daß die benutzte Methode (das *Mett*sche Verfahren) nicht empfindlich genug war, um die noch übrige „Hemmung" hervortreten zu lassen[2]).

Untersucht man in entsprechender Weise wie vorhin die Adsorption von Pepsin an Zwieback in einer Lösung, deren Reaktion $10^{-3,7}$ beträgt, welche Reaktion gerade an dem sauren Ende des Umschlaggebietes von Kongo gelegen ist, so wird sich zeigen, daß die Adsorption viel kräftiger ist, indem jetzt 50 mg Pepsin an 1 g Zwieback gebunden werden können, ohne daß jedoch die Adsorption eine maximale ist, im Gegensatz zu 9 mg, der größten Menge, die bei $p_H = 1{,}19$ gebunden werden konnte (s. Abb. 1). Da eine $p_H = 3{,}7$ oft in den Fällen vorkommen wird, die als Achylie oder Hypochylie bezeichnet werden, ist *Norgaards* Beobachtung leicht zu verstehen; wenn die achylische Probemahlzeit stark sauer gemacht wird, wird die gesamte Extramenge von Pepsin befreit und somit bestimmt werden können. Eine Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Erklärung ist es jedoch, daß die große, bei *einer* Reaktion gebundene Pepsinmenge abgespalten wird, wenn man die Reaktion in ein Gebiet umwandelt, in dem die Pepsinadsorption nicht so groß ist. Wünscht man, um einen näheren Einblick in die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Adsorptionserscheinung zu erhalten, die Adsorptionsverhältnisse bei einer Reihe von verschiedenen Reaktionen zu bestimmen, so kann man folgenden Versuch anstellen.

Zu 10 ccm Flüssigkeit mit verschiedener Wasserstoffionenkonzentration, sämtlich 1 g Zwieback enthaltend, wird dieselbe Pepsinmenge gesetzt; nach einstündigem Stehenlassen wird filtriert und die freie Pepsinmenge in gewöhnlicher Weise bestimmt, wobei jedoch zu bemerken ist, daß die Pepsinbestimmung selbst in allen Fällen bei der-

[1]) Arch. f. Verdauungskrankh. 8, 559, 1902.
[2]) Siehe auch *Ege*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 127, 135–136, 1923.

selben Reaktion ausgeführt wird, trotzdem die p_H der. Proben weit verschieden sind.

p_H	Zugesetztes Pepsin mg	Gefundenes Pepsin mg	Gebundenes Pepsin mg	Gebundenes Pepsin Proz.
0,1	30	3,2	26,8	82
1,14	30	9,5	20,5	67
2,5	30	7,6	22,4	74
3,5	30	2,9	27,1	90
4,0	30	3,2	26,8	89
5,0	30	7,9	22,1	74
5,3	30	14,5	15,5	52
5,9	30	22,0	8,0	27

In Abb. 2 zeigt die ausgezogene Kurve die Pepsinbindung, ausgedrückt in Prozenten der gesamten zugesetzten Pepsinmenge, bei verschiedenen Reaktionen.

Um zu untersuchen, ob das gebundene Pepsin in entsprechender Weise abgespalten wird, wurde ein Versuch angestellt, bei dem das Pepsin zu einem in einer Flüssigkeit aufgeschlämmten Zwieback gesetzt wurde, deren Wasserstoffionenkonzentration $10^{-3,3}$ betrug; nach einiger Zeit wurde die Reaktion geändert; während sich bei der ursprünglichen Reaktion ($p_H = 3,3$) nur 3 Proz. von freiem Pepsin fanden, wurde das Pepsin der punktierten Kurve gemäß abgespalten; man sieht, daß die Kurve, welche die Bindung des Pepsins angibt, nahezu mit derjenigen zusammenfällt, die die Abspaltung veranschaulicht.

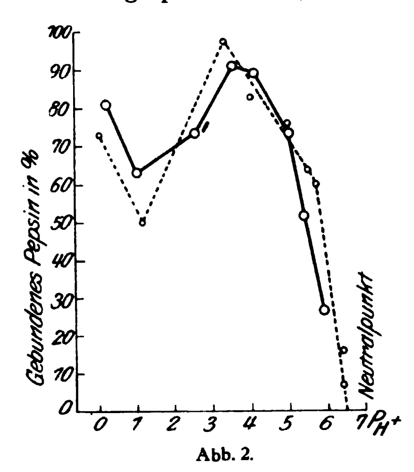


Abb. 2.

Die Kurve hat einen recht komplizierten Verlauf. Zu bemerken sind aber namentlich zwei Momente: das Pepsin wird bei Reaktionen von $p_H = 3$ bis 4 maximal gebunden; wird die Flüssigkeit saurer gemacht, so wird ein Teil des Pepsins befreit werden, so daß bei $p_H = 1,1$ [bei den vorhandenen Konzentrationsverhältnissen[1])] etwa die Hälfte der gesamten in der Probe vorhandenen Pepsinmenge befreit sein wird.

[1]) Das prozentische Verhältnis zwischen freiem und gebundenem Pepsin ist natürlich auch bei demselben p_H-Werte sehr variabel, da es auch durch die Pepsinkonzentration bedingt ist. Bei großer Pepsinkonzentration wird das gebundene Pepsin weit weniger, bei kleinen Konzentrationen wesentlich mehr bedeuten.

Was aber von größerem Interesse ist, ist der Umstand, daß das Pepsin gleichfalls abgespalten werden wird, wenn die Reaktion nach der noch schwächer sauren Seite hin geändert wird; denn diese Abspaltung ist im Gegensatz zu der anderen eine vollständige. Durch Änderung der Reaktion in $p_H = 6{,}5$ bis 6,8 wird es gelingen, sämtliches Pepsin, das an die Zwiebackpartikeln gebunden war, abzuspalten.

Ich gehe nun zur Besprechung der Zeit über, die beansprucht wird, wenn die Pepsinbindung und die Befreiung beendigt sein sollen.

Zu einer Aufschlämmung von Zwieback in einer Flüssigkeit, deren Wasserstoffionenkonzentration $10^{-3{,}5}$ beträgt, wird eine bekannte Pepsinmenge gesetzt; ab und zu werden Proben entnommen, die filtriert werden und deren freie Pepsinmenge bestimmt wird. Nach 3 Minuten waren bereits 73 Proz., nach 7 Minuten 90 Proz., nach $\frac{1}{2}$ Stunde 93 Proz. und nach $1\frac{1}{2}$ Stunden 95 Proz. gebunden; späterhin wird nicht mehr gebunden; jetzt besteht Gleichgewicht zwischen der freien und der gebundenen Pepsinmenge; die freie Pepsinmenge ist wie gewöhnlich bei dieser Reaktion ganz gering; zu einem gegebenen Zeitpunkt wird die Reaktion in eine sehr schwach saure (praktisch gesprochen neutrale) Reaktion geändert ($p_H = 6{,}8$). Die erste Probe wurde 1,5 Minuten nach der Reaktionsverschiebung entnommen und zeigte, daß sämtliches Pepsin, das bei $p_H = 3{,}5$ gebunden gewesen war, in weniger als 1,5 Minuten befreit worden war.

Die Adsorption beansprucht also eine gewisse Zeit (die Bindung ist jedoch, praktisch gesprochen, nach 10 Minuten gesättigt), während die Befreiung in sehr schwach saurer Lösung momentan zu verlaufen scheint.

Eine Erklärung der Adsorptionsverhältnisse des Pepsins vermag ich nicht zu geben. Das Pepsin wird von einer Reihe von fein verteilten Partikeln adsorbiert, weshalb man geneigt sein könnte, anzunehmen, daß die Adsorption an die einzelnen Zwiebackpartikeln als solche stattfindet. Ich neige jedoch mehr zu der Annahme, daß das Pepsin überwiegend an die Proteinstoffe des Weißbrotes gebunden wird. Untersucht man die Bindung des Pepsins an reinem auskoagulierten Muskelproteinstoff, so findet man nämlich im großen ganzen dieselbe Abhängigkeit zwischen Adsorption und Reaktion, die wir hier in betreff der *Ewald*schen Probemahlzeit dargestellt haben. Während es sich zeigt, daß die Adsorption des Pepsins an Blutkohle auch von der Wasserstoffionenkonzentration der Mischung abhängig ist, ist die Abhängigkeit aber von anderer Art; bei $p_H = 6{,}8$, wo das Pepsin vom Weißbrot und vom Proteinstoff befreit ist, liegt bei der Blutkohle einigermaßen maximale Bindung vor.

Die Bindung zwischen Pepsin und Fleisch ist noch kräftiger als die zwischen Pepsin und Weißbrot; aus den Adsorptionsverhältnissen

von Pepsin an Protein ersieht man, daß die *Bayliss*sche Erklärung der enzymatischen Prozesse als Adsorptionskatalyse jedenfalls nicht genügt; nach einer solchen Theorie wäre zu erwarten, daß die enzymatische Spaltung bei derjenigen Reaktion am schnellsten verlaufen müßte, bei der die Adsorption am kräftigsten ist. Dies ist aber nicht der Fall. Die Adsorption ist am ausgesprochensten bei $p_H = 3{,}5$ bis 4,5, bei welchen Reaktionen die Wirkung des Pepsins nur gering ist, während die Adsorption bedeutend weniger ausgesprochen ist bei $p_H = 2$, bei welcher Reaktion die optimale Pepsinspaltung der meisten Proteinstoffe stattfindet.

Pepsin findet sich in Ventrikelzellen als ein Vorstadium von Pepsin (Pepsinogen). Dieser Stoff vermag nicht Proteinstoffe zu spalten und muß erst von Säuren aktiviert werden. Über das Verhältnis zwischen Pepsinogen und Pepsin ist viel spekuliert worden. Es ist eine ausgebreitete Meinung, daß man hier einer Verbindung (Adsorptionsverbindung) zwischen dem Pepsin und einem Proteinstoff gegenübersteht, und daß das Pepsin in dieser Form unwirksam sein und erst wirksam werden sollte, wenn diese Verbindung aufgehoben wird. Diese Adsorptionsuntersuchungen scheinen eine solche Auffassung zu befürworten, und *Norgaard* weist daher auch auf die Möglichkeit hin, daß Pepsinogen einfach adsorbiertes Pepsin sei, aus dem das Pepsin durch Zusatz von Säure befreit werden sollte, für welche Auffassung *Jacoby* bereits früher eingetreten war.

Die *Verhältnisse liegen jedoch bei weitem nicht so einfach*, wie es scheinen mag, und ob Pepsinogen nun ein adsorbiertes Pepsin sei oder nicht, so ist jedenfalls von keiner Adsorptionsverbindung der Art die Rede, wie derjenigen, mit der ich mich hier beschäftigt habe. Das eigentliche Charakteristikum des Pepsinogens ist nicht die Inaktivität; das Pepsin selbst wird außerstande sein, die meisten Proteinstoffe zu spalten, wenn die Reaktion schwächer sauer ist als 10^{-4}. Was das Pepsinogen als einen vom Pepsin verschiedenen Stoff kennzeichnet, ist die verhältnismäßig große Widerstandsfähigkeit gegenüber schwachen basischen Lösungen im Gegensatz zum Pepsin, das — wie aus einem noch zu veröffentlichenden Aufsatz hervorgehen wird — momentan zerbricht. Es zeigte sich nun, daß das an die Probemahlzeit und an den Muskelproteinstoff adsorbierte Pepsin schwachen Basen gegenüber unbeständig ist, ganz wie das Pepsin, woraus folgt, daß kein direkter Anlaß dazu vorliegt, das adsorbierte Pepsin mit dem Pepsinogen, so wie dies in den Ventrikelzellen vorkommt, zusammenzustellen.

Ein anderer Umstand, der noch deutlicher zeigt, daß das Pepsinogen und das an Proteinstoff adsorbierte Pepsin zwei verschiedene Stoffe sind, ist, daß das Pepsinogen sich nicht aktivieren läßt, wenn die

Lösung nur sehr wenig sauer ist; Pepsinogen ist fortwährend als Pepsinogen vorhanden bei $p_H = 6$ bis 7 [und läßt sich, nach einigen vorläufigen Versuchen zu urteilen, erst bei $p_H = 3$ bis 4 aktivieren[1])]; bei $p_H = 6$ bis 7 ist aber sämtliches, an Proteinstoff gebundenes Pepsin abgespalten und in freier Form vorhanden. Daraus folgt, daß Pepsinogen nicht einem an die festen Partikeln der Probemahlzeit adsorbierten Pepsin gleichgesetzt werden kann.

Wenn man sowohl die Bedingungen der Verdauung im Ventrikel als die Funktionstüchtigkeit der Ventrikelzellen verstehen will, muß man die Wasserstoffionenkonzentration der Probemahlzeit und die gesamte Salzsäure, die der Ventrikel gebildet hat, bestimmen. Die Bestimmung der letzteren Größe ist mit Schwierigkeiten verbunden. Ich glaube jedoch, daß diese Schwierigkeiten sich überwinden lassen, und man das wahre Maß der Gesamtsäure gewinnt, wenn man den aufgeholten Mageninhalt bis zu der Reaktion titriert, die die eingegebene Probemahlzeit hatte, d. h. bei der *Ewald*schen Probemahlzeit bis zu $p_H = 5{,}6$[2]). (Als Indikator ist ein Brom-Cresol-Purpur wohl geeignet.)

Finden sich im Mageninhalt organische Säuren, muß deren Menge für sich bestimmt[3]) und von der in dieser Weise bestimmten Gesamtacidität abgezogen werden, um ein Maß der Salzsäure zu ergeben. Ebenso glaube ich, daß man, nachdem man gesehen hat, wie große Mengen Enzym adsorbiert und somit der Bestimmung entzogen sein können, genötigt ist, sowohl die freie Pepsinmenge als namentlich die gesamte Pepsinmenge zu bestimmen, da es wahrscheinlich erstere ist, die uns unter den vorliegenden Bedingungen über die aktive Pepsinmenge aufklären wird, während die gesamte Pepsinmenge für die Funktionstätigkeit der pepsinsezernierenden Zellen maßgebend ist.

Wünscht man, in einem Ventrikelinhalt sowohl die freie als die gebundene Pepsinmenge zu bestimmen, so kann man folgendermaßen verfahren:

A. *Freies Pepsin.* Die Probe wird geschüttelt, so daß eine gleichmäßige Verteilung von Flüssigkeit und aufgeschlämmten Bestandteilen vorliegt; von der Probe wird ein wenig auf ein kleines dichtes Filter gegossen; die erste durchlaufende Menge Flüssigkeit wird kassiert, teils weil sie oft ein wenig getrübt sein wird, teils weil es möglich ist, daß das Filtrierpapier ein wenig Pepsin an sich bindet. Wenn die

---

[1]) Die Untersuchungen hierüber finden sich bei *E. Gottlieb*, Skand. Arch. f. Physiol. (im Druck).

[2]) Siehe *Rich. Ege*, Om Totalaciditets Bestemmelse i Ventrikelindhold. Hospitalstidende 1922 (Dänisch).

[3]) *Rich. Ege*, diese Zeitschr. 134, 1923.

Wasserstoffionenkonzentration der Probe größer ist als 10^{-2} (wenn p_H nicht kolorimetrisch bestimmt wird, wird eine positive *Günzburg*sche Reaktion entscheidend sein; ein kräftiges Kongo kann meist auch benutzt werden), wird die freie Pepsinmenge erfahrungsmäßig eine recht bedeutende sein[1]), weshalb man 0,1 ccm von der Probe zur Analyse benutzen muß; wenn Kongo (oder *Günzburg*) negativ ist, wird der größte Teil der vorhandenen Pepsinmenge gebunden sein[1]), so daß es in diesem Falle vorteilhaft sein wird, 1 ccm zu benutzen; die abgemessene Probe wird zu 10 ccm Edestinlösung gesetzt (ergänzt durch n-Weinsäurelösung, so daß man immer mit 11 ccm Gesamtvolumen arbeitet); nachdem die Probelösung zugesetzt worden ist, wird das Glas geschüttelt und bei 40° auf das Wasserbad gestellt; nach genau einer halben Stunde wird das Glas in kochendes Wasser hinübergebracht, damit die Enzymspaltung unterbrochen werden soll; nach etwa 5 Minuten Aufenthalt darin wird das Glas herausgenommen und abgekühlt, worauf 1 ccm Gummiarabikum zugesetzt wird und die Titration stattfindet. Wenn die Verdauung durch Stehenlassen in 100° warmem Wasser unterbrochen worden ist, kann man übrigens die Probe stehenlassen und die Bestimmung zu beliebiger Zeit ausführen.

B. *Gesamtpepsin.* Es wird 1 ccm von der Probemahlzeit, Flüssigkeit und feste Partikeln untereinander abgemessen[2]) — dies geschieht am besten mittels einer 1-ccm-Differentialpipette, von der man die Spitze abgeschnitten hat; dazu werden 19 ccm Phosphatlösung gesetzt, worauf ein paar Minuten lang gründlich geschüttelt wird; unmittelbar danach wird durch ein dichtes Filter filtriert; die erste durchgelaufene Menge wird kassiert. Im Filtrat findet sich sämtliches Pepsin in freiem Zustande; zu 10 ccm Edestinlösung wird 1 ccm Filtrat gesetzt, und die Bestimmung wird ganz wie vorhin ausgeführt. Die Zeit vom Zusatz der Phosphatlösung bis zum Zusatz des Filtrats zu der sauren Edestinlösung darf keine 5 bis 10 Minuten übertreffen, da das Pepsin bei der betreffenden Reaktion nicht beständig ist.

Die Phosphatlösung besteht aus gleichen Volumina primären und sekundären Phosphats (*Sörensen*) $p_H = 6{,}8$. Das primäre Phosphat enthält 9,078 g KH_2PO_4 in 1 Liter H_2O.

---

[1]) Dies wird natürlich nur gewöhnlich der Fall sein; es können Ausnahmen vorkommen.

[2]) Da die gebundene Pepsinmenge außer vom Sauerheitsgrade und der freien Pepsinkonzentration von der Menge fester Partikeln abhängig ist, an die das Pepsin gebunden werden kann, hat man, wie *Norgaard* vorschlägt, deren Menge zu bestimmen.

Der von *Norgaard* angewandten Senkungsbestimmung haften jedoch sicherlich große Fehler an, da Schleiminhalt u. dgl. auf das Resultat einen sehr großen Einfluß ausüben. Besser, aber auch bedeutend beschwerlicher wäre natürlicherweise eine Trockensubstanzbestimmung.

Das sekundäre Phosphat enthält 11,876 g Na_2HPO_4 in 1 Liter.

Bei Berechnung der Pepsinkonzentrationen muß auf die verschiedenen Verdünnungsverhältnisse, mit denen man gearbeitet hat, Rücksicht genommen werden.

Der Unterschied zwischen der gesamten Pepsinmenge und der freien — oder der bei 10^{-1} befreiten — Pepsinmenge bei normalen Individuen und bei Patienten mit Ventrikelleiden wird sich aus der folgenden Tabelle ergeben. Die untersuchten Probemahlzeiten stammen aus der zweiten Abteilung des Kommunehospitals, deren Chefarzt, Dr. med. *H. Bing*, mir bei der Untersuchung behilflich war, wofür ich hier meinen besten Dank ausspreche.

Pepsinbestimmungen an *Ewald*schen Probemahlzeiten aus Patienten ohne Ventrikelleiden. Die Probemahlzeit wurde nach 3/4 bis 1 Stunde aufgeholt.

p_H	Phenolphthaleinzahl	Freies Pepsin Proz.	Pepsin bei 10^{-1} Proz.	Gesamtpepsin Proz.
1,5	76	0,45	0,47	0,60
2,0	55	0,170	0,24	0,39
2,4	56	0,60	—	0,62
2,1	92	0,80	—	1,17
2,0	57	0,72	—	1,02
1,6	82	0,87	—	1,10
1,7	74	0,87	—	1,10
1,8	80	0,44	—	0,86
Reiner Magensaft eines normalen Hundes.				
0,8	130	1,15	—	—

Bei Patienten mit „Achylie“ und „Hypochylie“ wird der Unterschied zwischen freiem und gebundenem Pepsin, wie wir aus den vorhergehenden Reagenzglasversuchen schließen können, weit ausgesprochener sein. Dies war auch der Fall.

Pepsinbestimmungen an Patienten mit Ventrikelleiden.

p_H	Phenolphthaleinzahl	Freies Pepsin	Pepsin bei 10^{-1}	Gesamtpepsin
a) „Achylie“ und „Hypochylie“.				
3,5	26	0,01	0,17	0,27
5,0	36	0,13	—	0,06
4,8	40	0,034	—	0,67
5,6	53	0,003	—	0,40
b) Hyperchlorhydrie.				
1,2	100	0,43	—	0,49

Später ist in derselben Abteilung und nach demselben Verfahren von *H. Rasmussen* eine sehr große systematische Untersuchung über den Pepsin- und Säuregehalt von *Ewald*schen Probemahlzeiten aus einer Reihe von Patienten ausgeführt worden. Das Ergebnis dieser Untersuchungen schließt sich den wenigen hier mitgeteilten Zahlen recht genau an.

In Fällen von Hypochylie finden wir einen sehr genauen Parallelismus zwischen den Zahlen der Gesamtsäure und des Gesamtpepsins.

In der Klinik waren es von jeher die Säureuntersuchungen, die eine diagnostische Bedeutung hatten; es läßt sich aber die Möglichkeit nicht ausschließen, daß eine quantitative Bestimmung der gesamten Pepsinmenge auch eine Bedeutung für die Diagnose erhalten könnte. Aus den in der Literatur vorliegenden Untersuchungen läßt sich nichts Zuverlässiges schließen; teils benutzte man nur in den wenigsten Fällen ein Verfahren, das imstande war, die Pepsinkonzentration in zuverlässiger Weise zu ermitteln, teils war man nicht auf die Bestimmung der tatsächlich von den Ventrikelzellen gebildeten Pepsinmenge aufmerksam.

Auch für die Therapie hat die Bestimmung der wahren Pepsinmenge eine gewisse Bedeutung. Zuvörderst haben diese Untersuchungen über die Pepsinadsorption uns gelehrt, wie große Mengen Pepsin der Ventrikel im Vergleich mit der Aktivität der benutzten Pepsinpräparate ausscheidet. Wie große Pepsinmengen der Ventrikel bildet, läßt sich nicht mit Sicherheit angeben; sie lassen sich in verschiedener Weise veranschlagen und sind kaum zu weniger als 10 g Armourpepsin täglich anzusetzen.

Da die Pepsinmengen, die man bisher eingegeben hat, weit unter 1 g täglich liegen, versteht man schwer die Bedeutung davon, namentlich nicht, wenn man in Betracht zieht, daß die kleinste bisher von mir gefundene Pepsinmenge zu 0,5 g angesetzt werden muß; in anderen Fällen mit deutlich herabgesetztem Pepsin betrug die vom Ventrikel gebildete Menge etwa 3 bis 5 g; die Bedeutung von einer Zufuhr von 0,2 bis 0,5 g ist somit nicht als einleuchtend zu bezeichnen.

Dazu kommt aber noch ein anderer Umstand. Es ist ja gegeben, daß es ohne Bedeutung ist, einem Patienten mit Achylie Pepsin zuzuführen, es sei denn, daß man gleichzeitig dafür Sorge trägt, die Reaktion im Ventrikel durch Säureeingabe bis auf einen Sauerheitsgrad zu steigern, bei dem das Pepsin zu wirken vermag, und die Säuremenge, die gewöhnlich in Fällen von Achylie eingegeben wird, ist ja so gering, daß sie keine direkte Bedeutung hat.

Zusammenfassung.

Das Pepsin wird in sehr bedeutendem Maße an die gewöhnlichen Nahrungspartikeln adsorbiert.

Die Adsorption ist sehr abhängig von der Reaktion, indem sie maximal ist bei $p_H = 3$ bis 4, geringer bei $p_H = 1$ und gleich Null ist bei $p_H = 6{,}8$.

Den meisten der in der Literatur angeführten Pepsinwerte werden größere oder geringere Fehler anhaften, da auf das gebundene Pepsin keine Rücksicht genommen worden ist.

Über ein neues Prinzip zur indirekten Bestimmung der Kohlensäure und des respiratorischen Quotienten mit dem Differenzspirometer[1]).

Von

Egon Helmreich und **Richard Wagner.**

(Aus der Universitätskinderklinik in Wien.)

(Eingegangen am 17. Dezember 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Durch die Einführung des graphisch registrierenden Verfahrens zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach *Krogh*[2]) ohne Analyse der Respirationsluft ist daraus eine allgemein zugängliche, leicht und schnell durchführbare klinische Untersuchungsmethode geworden. Zur Bestimmung der CO_2-Ausscheidung und damit des respiratorischen Quotienten war man bislang immer auf die gasanalytische Untersuchung der Respirationsluft angewiesen — eine Methode, welche Zeit, Übung und Mühe erfordert. Es lag daher nahe, das graphische Verfahren, wie wir es in der *Krogh*schen Methode kennen gelernt hatten, so zu gestalten, daß sich auch die CO_2-Ausscheidung — wenn auch auf indirektem Wege — aus dem Verlauf einer Kurve ablesen läßt.

Das Prinzip des von uns angewendeten Apparates beruht darauf, daß unter demselben beweglichen, mit dem Schreiber versehenen Spirometerdeckel das zu verbrauchende Sauerstoffvolumen, aus dem die Versuchsperson atmet, und das Volumen der ausgeschiedenen Kohlensäure nebeneinander, aber voneinander getrennt vorhanden sind; für die beim Inspirium verbrauchte Sauerstoffmenge tritt das im Exspirium ausgeschiedene CO_2-Quantum unter den Deckel und hebt ihn wieder. Ist der respiratorische Quotient gleich 1, so hat am Ende des Exspiriums der Deckel die Höhe seiner Ausgangsstellung wieder erreicht; ist der respiratorische Quotient < 1, d. h. ist die produzierte CO_2 kleiner als das verbrauchte Sauerstoffvolumen, dann wird der Deckel am Ende des Exspiriums weniger hoch angestiegen sein, als der Ausgangsstellung entspricht. Wird eine Reihe von Atemzügen durch mehrere Minuten auf einer rotierenden Trommel verzeichnet, so ergibt sich entweder ein wagrechter oder mehr oder minder ab-

[1]) Nach einer Mitteilung in der Sitzung der Gesellschaft der Ärzte in Wien vom 7. Dezember 1923.

[2]) Wien. klin. Wochenschr. 1922, S. 290.

fallender Verlauf des Stethogramms. Das oben erwähnte Auseinanderhalten von Reservoirsauerstoff, aus dem inspiriert wird, und der Exspirationsluft geschieht in der Weise, daß das Exspirium in einen luftdichten Sack gelangt, der aus dünnen und leichten Gummiplatten geklebt ist; der Sack muß einen so großen Fassungsraum besitzen, daß er auch am Ende des Versuchs nur so weit gefüllt ist, daß seine Wände nicht gedehnt werden müssen, wodurch der Widerstand in allen Phasen des Versuchs gleich gering bleibt und jede Stauung von CO_2 im Körper vermieden wird. Wenn der Sack gefüllt ist und den ihm zur Verfügung stehenden Raum des Spirometers ausfüllt, hebt er den Deckel ab. Die Länge des Versuchs ist somit durch die Größe des Sackes implicite gegeben.

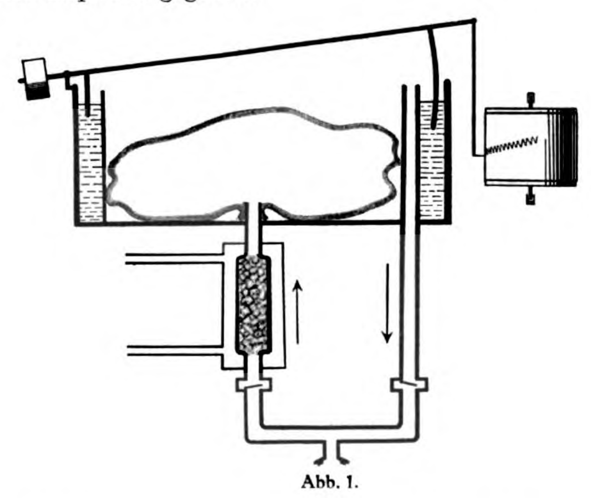


Abb. 1.

Der Apparat (Abb. 1) ist ein viereckiges Spirometer aus Blech von etwa 40 Liter Fassungsraum nach Art des auch von *Krogh* verwendeten Spirometers; an den Seiten befindet sich eine Dichtungsrinne, welche mit Wasser gefüllt ist; dort tauchen die umgebogenen Ränder des Spirometerdeckels ein und schließen den Raum luftdicht ab.

Der Deckel ist leicht (eventuell aus Aluminium herzustellen) und mit einem Gegengewicht ausbalanciert. Er dreht sich um eine horizontale Achse und der vordere Teil geht bei der Atmung auf und ab.

Aus diesem Spirometer wird geatmet, und zwar gelangt die Luft durch ein Inspirationsrohr und Mundstück in den Körper; durch ein Exspirationsrohr wird die Atmungsluft wieder in das Spirometer, und zwar in den erwähnten Gummisack zurückgeschickt.

Zwei Ventile regeln die Richtung des Luftstromes.

In den Expirationschlauch ist das Chlorcalciumrohr eingeschaltet, das die Exspirationsluft ihres Wasserdampfes beraubt. Das Chlorcalciumrohr ist mit einem Kühler umgeben. Mit dem Deckel ist ein Schreiber fest verbunden, der auf einer rotierenden Trommel die Atmung aufzeichnet.

In den Sack gelangt neben der CO_2 auch der vom Körper nicht verbrauchte Sauerstoff. Da es sich aber nur um Registrierung der bloßen Volumsänderung im Gesamtsystem des Apparates handelt, so ist es bedeutungslos, ob der unverbrauchte Sauerstoff zum Reservoirsauerstoff zurückkehrt (wie beim *Krogh*schen Apparat) oder ob er mit der CO_2 in den Sack gelangt.

Es ergibt weiterhin keinen Fehler, daß im Sacke auch der ausgeatmete Stickstoff sich sammelt, wenn aus dem Spirometer nicht reiner Sauerstoff, sondern atmosphärische Luft geatmet wird; dadurch gelangt in den Sack ebensoviel Stickstoff, als aus dem Spirometer geschöpft wird.

Ein möglicher Einwand wäre der, daß sich bei Ausatmung in den Sack CO_2 in den Luftwegen sowie in Blut und Geweben stauen könnte, was einen zu niedrigen respiratorischen Quotienten ergeben müßte. Dieser Einwand läßt sich aber dadurch entkräften, daß der Sack sich im Verlauf des Versuchs dauernd erweitert, die CO_2-Spannung in dem Exspirationsgemisch immer konstant bleibt und nicht größer wird als in Trachea, Bronchien und Alveolen. Übrigens wird auch bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach *Krogh* gegen jene CO_2 exspiriert, welche im Exspirationsrohr bis zum Ventil stehen bleibt.

Der aus den Lungen kommende Wasserdampf wird vor dem Eintritt in den im Spirometer liegenden Sack von Chlorcalcium absorbiert. Die Abkühlung der Exspirationsluft, die Körpertemperatur besitzt, auf Zimmertemperatur wird durch einen Kühler bewerkstelligt, der das Exspirationsrohr umgibt. Der Auftrieb des Spirometerdeckels ist immer nahezu konstant, da der Abfall der Kurve bzw. des Deckels bei einer Versuchsdauer von 4 bis 5 Minuten maximal nur wenige Millimeter beträgt. Damit ist gewährleistet, daß der Atemchemismus während der ganzen Versuchsdauer der gleiche bleibt, weil der an sich geringe Widerstand, der dem Exspirium entgegensteht, sich nicht ändert. Die Inspirationsluft muß vor dem Einlaß in das Spirometer getrocknet werden, indem man sie durch Chlorcalcium leitet. Da in der Dichtungsrinne des Spirometers zum luftdichten Abschluß des Systems sich Wasser befindet, muß dieses, damit die Entwicklung von Wasserdampf vermieden werde, mit einer dünnen Schicht von Paraffinum liquidum bedeckt sein.

Die zwischen den Einzelversuchen notwendige Entleerung des Sackes wird dadurch erreicht, daß man unter den Spirometerdeckel Luft so lange einströmen läßt, bis beim Exspirationsansatz des Spirometers aus dem Sacke keine Luft mehr abfließt.

Die Größe des Abfalls der Stethogramme, sowie die Höhendimensionen der aufgezeichneten Atemzüge sind der Fläche des beweglichen Deckels invers proportional, hängen aber nicht vom Kubikinhalt des Spirometers ab.

Tabelle I.

Datum	Name und Geschlecht	Nahrungszufuhr und Zeitpunkt der Untersuchung	O_2-Verbrauch nach *Krogh* ccm	$O_2 - CO_2$ (mit dem Differenz-spirometer) ccm	CO_2 ccm	R. Q.
4. XI. 1923	*M.* ○	Nüchtern	235	56	179	0,76
		85 g Traubenzucker:				
		75 Minuten später . .	240	24	216	0,90
				32	208	0,87
		145 Minuten später . .	253	35	218	0,86
				40	213	0,84
5. XI. 1923	*M.* ○	2 Stunden nach der Nachmittagsmahlzeit (Milch)	265	66	199	0,75
				62	203	0,77
		Nach der Untersuchung 150 g Rohrzucker: $1^1/_2$ Stunden später .	259	45	214	0,83
9. XI. 1923	*B.* △	$^1/_2$ Stunde nach der Abendmahlzeit (gemischte Kost, fettreich)	240	67	173	0,72
				68	172	0,72
				63	177	0,74
		2 Stunden später . . .	259	80	179	0,72
10. XI. 1923	*K.* △	1 Std. nach Kartoffelsalat	254	43	211	0,83
				33	221	0,87
11. XI. 1923	*M.* ○	Nüchtern	249	75	174	0,70
				66	183	0,73
				59	190	0,76
				70	179	0,72
12. XI. 1923	*M.* ○	Nüchtern	258	60	198	0,77
				60	198	0,77
				68	190	0,74
13. XI. 1923	*B.* △	2 Stunden nach der Abendmahlzeit (gemischte Kost)	259	52	207	0,80
				50	209	0,81
				50	209	0,81
				54	205	0,79
14. XII. 1923	*K.* △	3 Stunden nach der Nachmittagsmahlzeit (Milch)	256	72	184	0,72

Um den Abfall der Kurve nach Kubikzentimetern werten zu können, ist es nötig, den Niveauunterschied in der Stellung des Deckels bei einer Volumsänderung von bekannter gewählter Größe festzustellen. Nach Eichung des hier beschriebenen *Differenzspirometers* läßt sich der Maßstab ermitteln, mit dessen Hilfe der Abfall des Stethogramms ausgemessen wird. Man kann auch den zum *Krogh*schen Apparat gehörigen Maßstab verwenden, wenn man den Umrechnungsfaktor ermittelt, der auch schon aus dem einfachen, rechnerischen Vergleich der Deckelflächen beider Apparate hervorgeht.

Der Ausschlag unseres Apparates ergibt die Volumsdifferenz zwischen verbrauchtem Sauerstoff und ausgeschiedener Kohlensäure. Ist der Sauerstoffverbrauch mit irgend einer Methode, z. B. nach *Krogh*, ermittelt worden, so kennt man damit auch die Größe der CO_2-Ausscheidung, bzw. des respiratorischen Quotienten. Ebenso wie bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach *Krogh* und übrigens auch anderen gasanalytischen Methoden (*Zuntz-Geppert*) ist regelmäßige und gleichmäßige Atmung eine unerläßliche Voraussetzung für die Richtigkeit der erhaltenen Werte, weswegen entsprechende Vorversuche zur Einübung auch hier nötig sind.

In der vorhergehenden Tabelle geben wir eine Übersicht über die Resultate einiger Versuche wieder.

In der vorliegenden Mitteilung sind in erster Linie das Prinzip der Methode sowie Resultate mit der ersten, vielleicht noch nicht endgültigen Form des Apparates niedergelegt worden. Allfällige Mängel in der technischen Konstruktion des Apparates sollen erst verbessert werden, bis die damit gefundenen Resultate durch Vergleichung mit einer der approbierten Standardmethoden zur Bestimmung der CO_2-Ausscheidung als *absolute* Werte sichergestellt sein werden. Aber es sei schon an dieser Stelle hervorgehoben, daß, soweit sich die Fehlerquellen überblicken lassen, im großen und ganzen nur dieselben Einwände dagegen erhoben werden können, die gegen die Methode zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach *Krogh* bestehen. Der Vorteil einer so einfachen graphischen Bestimmungsmethode der CO_2 und des respiratorischen Quotienten gegenüber der analytischen für den klinischen Gebrauch liegen auf der Hand.

Der Apparat wird bei der Firma Castagna & Co., Wien VII, Neustiftgasse 3, hergestellt. Auf Wunsch von Prof. *Pirquet* wurde das Patent angemeldet.

Über Veränderungen des Blutes in vitro.

Von

L. Berczeller und H. Wastl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1923.)

Viele chemische Untersuchungen des Blutes beruhen darauf, daß wir das Blut in flüssigem Zustande aufbewahren können. Das äußerlich gleiche Aussehen von ungerinnbar gemachtem Blute täuscht dabei nur allzu leicht über grundsätzliche biologische Unterschiede hinweg, die mit der Zeit in solchen Blutproben auftreten können.

Einer von uns[1]) konnte nachweisen, daß beim Verzehr von Sauerstoff und der Bildung von CO_2 (als eine der auffälligsten Lebenserscheinungen des Blutes) eine sehr wesentliche Veränderung mit der Zeit stattfindet (Versuche an Hundeblut). Nach 24stündigem Stehen bei Körpertemperatur (steril) nehmen beide Vorgänge auf ein Minimum ab, das Blut „stirbt" allmählich. Wenn es auch noch nicht entschieden ist, worauf dieser Mechanismus beruht, so ließ sich doch nachweisen, daß die beiden Vorgänge nicht gleich empfindlich sind.

Die Senkung der roten Blutkörperchen ist eine äußerst empfindliche Reaktion, die sonst schwer meßbare und verfolgbare Zustandsänderungen im Blute anzeigen kann, und aus diesem Grunde lag der Gedanke nahe, die zeitlichen Veränderungen des Blutes in vitro mit ihrer Hilfe zu verfolgen.

Es ist zwar schon lange bekannt, daß die Senkung der roten Blutkörperchen sich mit der Zeit, die zwischen Blutentnahme und Untersuchung gelegen ist, verändern kann, diesbezügliche systematische Untersuchungen fehlen aber bisher, obwohl der Zeitfaktor bei der diagnostischen Verwendung der Senkungsprobe von wesentlichem Einfluß ist. Auch im Verlaufe des Einzelversuchs kann die Senkungsgeschwindigkeit durch Veränderungen des Blutes in vitro beeinflußt werden.

---

[1]) *L. Berczeller*, diese Zeitschr. **90**, 294ff., 1918.

Wir lassen diese unsere Versuche jetzt folgen, nachdem wir[1]) eine Reihe anderer wirksamer Faktoren einer Analyse unterworfen haben. Die Untersuchung der zeitlichen Veränderung der Blutkörperchensenkung ist nicht nur in methodischer Hinsicht, sondern auch für die nähere Erkenntnis des Gerinnungsvorganges von gewisser Wichtigkeit. Zur Erklärung der gerinnungshemmenden Wirkung der Oxalate, Citrate, Fluoride wurde bis vor kurzem angenommen, daß diese Salze infolge der Veränderung der $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionenkonzentration ihre Wirkung ausüben. Erst die Untersuchungen von *Stuber*[2]) haben mit dieser an und für sich recht unwahrscheinlichen Annahme aufgeräumt. Nach diesen wirken die genannten Salze auf das Fibrinogen ein.

Nun ist die Bedeutung des Fibrinogens für die Senkung der roten Blutkörperchen allgemein bekannt. Der Senkungsversuch muß also eine geeignete Methode für die Untersuchung der Veränderungen des Fibrinogens sein, wenn wir die anderweitig wirksamen Faktoren ausschließen können. Bevor aber auf die Differenzen der Senkung im Plasma — bei Zusatz verschiedener, gerinnungshemmender Substanzen — vergleichend eingegangen werden kann, müssen erst die zeitlichen Veränderungen des Blutes in vitro, sofern sie den Senkungsvorgang beeinflussen, verfolgt werden.

Zunächst soll das Verhalten des *defibrinierten Blutes* geprüft werden. In den vorangehenden Mitteilungen (l. c.) konnte wiederholt gezeigt werden, daß die Senkung der roten Blutkörperchen durch das Vorhandensein des Fibrinogens wesentlich kompliziert wird. Auch bei den einfacheren Verhältnissen im defibrinierten Blute kann durch die Schüttelwirkung insofern eine Komplikation eintreten, als durch ein kurzdauerndes Schütteln in vielen Fällen eine wesentliche Beschleunigung der Senkung verursacht werden kann; eine zeitliche Abnahme der Senkung im defibrinierten Blute kann daher eventuell auch auf ein Verschwinden der durch das Schütteln beim Defibrinieren verursachten Zunahme der Senkung zurückgeführt werden. Diese Frage soll weiter unten behandelt werden.

In Tabelle I ist ein ausgewählter Überblick aus Versuchsreihen, die zur Lösung dieser Fragen ausgeführt wurden, angegeben, wobei besonders auf eine Zusammenstellung möglichst verschiedenen Materials Gewicht gelegt wurde.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß mit wenigen Abweichungen die Senkung der roten Blutkörperchen mit der Zeit (wenn die Blutproben verschieden lange Zeit nach der Blutentnahme zum Senkungsversuch aufgestellt worden waren) eine wesentliche Abnahme aufweist.

[1]) Diese Zeitschr. 1923 und 1924.

[2]) Zusammenfassung: Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 49 u. 50. Hier die Literaturangaben über frühere Arbeiten.

Tabelle I. Defibriniertes Blut.

	Geschlecht	Veränderung in etwa 24 Std.				Veränderung in etwa 48 Std.				Bemerkungen
		90^0	$67^1/_2{}^0$	45^0	$22^1/_2{}^0$	90^0	$67^1/_2{}^0$	45^0	$22^1/_2{}^0$	
Mensch . .	♀	A	A	A	A					Normal, CO_2-gesättigt
„ . .	♀	A	A	A	A					Dasselbe
„ . .	♀	A	A	A	A					Dasselbe
„ . .	♀	A	Minim. Abn.			A	A	A	A	Schwangere, CO_2-gesättigt
„ . .	♀	Minimale Abnahme								Schwangere
„ . .	♀					A	A	A	A	Hypertonie, O_2-gesättigt
„ . .	♀	A	A	A	A					Hypertonie, CO_2-gesättigt
„ . .	♂	A	A	A	A					Normal, CO_2-gesättigt
„ . .	♂					A	A	A	A	Tbc.
Schwein . .	♀	A	A	A	A					
„ . .	♀	A	A	A	A	A	A	A	A	
„ . .	♀					A	A	A	A	
Hund . . .	♂	A	A	A	A	A	A	A	A	
„ . . .	♀	A	A	A	A					
Katze . . .	♀					A	A	A	A	CO_2-gesättigt
„ . . .	♀					A	A	A	A	O_2 „
„ . . .	♀					A	A	A	A	H_2 „
„ . . .	♂	A	A	A	A					
„ . . .	♂	A	A	A	A	A	A	A	A	
Kaninchen	♀	min.A	A	A	A	min.A	A	A	A	
„	♀	min.A	A	A	A	min.A	A	A	A	O_2 „
„	♀	min.A	A	A	A	min.A	A	A	A	CO „
„	♀	A	A	A	A	A	A	A	A	CO_2 „
„	♂	min.A	A	A	A					„ „
Hammel . .	♂	Keine Abnahme								
Ochse . . .		min.A	A	A	A					
Pferd . . .		A	A	A	A					
„ . . .	Wallach	A	Z	Z	A					
„ . . .	„	Z	Z	Z	A					Geschüttelt
„ . . .	♀	Z	=	=	A					
Huhn . . .	♀					A	A	A	A	

A = Abnahme, Z = Zunahme, = Gleichheit der Senkungsgeschwindigkeit bezogen auf das Senkungsvermögen frisch nach der Entnahme. Untersuchung unter verschiedenen Winkeln. Etwa 2 mm weite Röhrchen, 130 mm lange Blutsäule.

Unter den angeführten neun menschlichen Blutproben weisen nur zwei Proben von Schwangeren insofern eine Ausnahme auf, als in den ersten 24 Stunden keine wesentliche Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit nachweisbar ist, dagegen wohl nach 48 Stunden, so daß die beiden Schwangerenblutproben sich auch nicht prinzipiell anders verhalten wie die übrigen menschlichen Blutproben (Schwangerenblut zeigt bekanntlich ein erhöhtes Senkungsvermögen gegenüber normalem Blute).

Beim Hammelblute, das auch, wie in einer früheren Mitteilung erwähnt wurde, gegen O_2- bzw. CO_2-Wirkung unempfindlich ist, ist keine Abnahme der Senkung zu beobachten.

Nur beim Pferdeblut haben wir in einigen Fällen, wenn auch nicht regelmäßig, nach 24 Stunden einen schnelleren Ablauf der Senkung beobachten können. Jedenfalls spielt beim Pferdeblut die Agglutination der roten Blutkörperchen eine viel größere Rolle. Ein Fortschreiten der Agglutination mit der Zeit kann eine so große Zunahme des Senkungsvermögens verursachen, daß sie die Abnahme mit der Zeit überwiegen kann.

Das gleichmäßige Verhalten der anderen Blutarten [Mensch, Schwein, Hund, Katze, Kaninchen[1]), Ochse, Huhn], wobei nur Hammel- und Pferdeblut Ausnahmen bilden, machen es notwendig, zunächst diese ersteren quantitativ zu vergleichen.

In *quantitativer* Hinsicht ist die Veränderung der Senkungsgeschwindigkeit mit der Zeit eine sehr verschiedene bei den verschiedenen Blutproben und -arten. Die allergrößte Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit konnten wir beim Hühnerblute beobachten.

Tabelle II.
Zeitliche Veränderungen der Senkung von defibriniertem Hühnerblut ♀.

Senkungszeit in Minuten	90°		67½°		45°		22½°	
	nach Stunden Stehen							
	2	47	2	47	2	47	2	47
60	4,5		36,0		60,0		74,0	
80	6,5	0,20	47,0	2,0	67,0	7,0	78,0	11,5
120	10,0	0,25	69,0	5,5	81,0	15,0	88,0	23,0
180	18,0	0,5	74,0	11,0	87,0	26,0	90,0	35,0
310	75,0	1,0	86,0	30,0	92,0	44,0	95,0	50,0
480		8,0		56,0		59,0		62,5
1260	80,0		99,0		99,0		100,0	
1400		28,0		65,0		67,0		69,0

130 mm lange Blutsäule, 2 mm weite Röhrchen, freie Flüssigkeitshöhen in Millimetern.

Binnen 2 Tagen sinkt das Senkungsvermögen der roten Blutkörperchen auf einen kleinen Bruchteil der Geschwindigkeit, welche bald nach der Entnahme beobachtet wurde. Bei diesen großen Unterschieden sind die Differenzen auch in den vertikal gestellten Röhren gut nachweisbar, was bei den anderen Blutproben nicht immer der Fall war. Wenn auch im Versuchsbeginn die Differenzen in den Wegstrecken in den schief gestellten Röhren (zwischen den frisch und nach Stehen untersuchten Proben) die größeren sind, so finden wir dennoch

[1]) Beim Kaninchenblut ist in mehreren Fällen in den bei 90° aufgestellten Röhrchen die Senkung eine ganz geringe, so daß nur minimale Unterschiede zwischen frisch und nach verschieden langer Zeit aufgestellten Proben nachgewiesen sind.

bei 90° die maximalen Zunahmen der Verhältniszahlen der Geschwindigkeiten, so daß die beiden Messungen sich in zweckmäßiger Weise ergänzen, denn bei 90° lassen sich die bei langsamer Senkung zurückgelegten Wege schwerer mit genügender Genauigkeit messen, dagegen ist bei Schiefstellung der Röhren der Unterschied weniger ausgesprochen. Als maximaler Unterschied zeigt sich in diesem Beispiel, daß die roten Blutkörperchen kurz nach der Entnahme in der gleichen Zeit einen 45mal längeren Weg zurücklegen wie nach etwa 48stündigem Stehen des Blutes (nach 310 Minuten bei 90°). Der maximale Wegunterschied ist dagegen bei 22,5° zu beobachten, indem die roten Blutkörperchen der frischen Probe die der zweiten mit 66,5 mm, also mit etwas mehr als der Hälfte der gesamten benutzten Blutsäule, zurücklassen (nach 80 Minuten bei 22,5°).

Die anderen von uns untersuchten Blutarten bleiben in der Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit mit der Zeit weit hinter dem Hühnerblute zurück. Insbesondere gilt dies für die Senkung in den schiefer gestellten Röhren, was aber keineswegs auf die große Senkungsgeschwindigkeit des defibrinierten Hühnerblutes zurückzuführen ist.

Tabelle III.

Weibliches Menschenblut, defibriniert (Hypertonie).

Zeit in Minuten	90°				67½°			45°			22½°		
	Gesättigt mit												
	CO_2		O_2		CO_2		O_2	CO_2		O_2	CO_2		O_2
	Stunden nach Entnahme												
	6	24	6	48	6	24	48	6	24	48	6	24	48
30	15,0	1,0	17,0	8,0	41,0	23,0	56,0	46,5		73,0	47,5		81,0
50	17,5	3,5	39,0	17,0	71,0	47,5	72,0	73,0	67,0	78,0	77,0	74,0	85,0
80	35,0	9,0	57,0	30,0	78,0	64,0	78,0	78,0	73,0	82,0	80,0	78,0	87,0
110	48,0	18,0			81,0	70,0		79,0	75,0		81,0	80,0	
1020	82,0		80,0		86,0			83,0			86,0		
1700		73,0		82,0		78,0	86,0		82,0	86,0		84,0	90,0

2 mm weite Röhrchen, Blutsäule 130 mm lang.

In Tabelle III ist das Blut einer Hypertoniepatientin 6, 48 und 24 Stunden nach der Entnahme untersucht angegeben, und obgleich die Senkung viel schneller als im Hühnerblute stattfindet, ist die Abnahme mit der Zeit eine viel geringere (das Blut wurde teils mit CO_2, teils mit O_2 gesättigt untersucht). Sie hängt also nicht von der größeren Senkungsgeschwindigkeit gleich nach der Entnahme ab, was insofern in Betracht kommt, weil im allgemeinen im Plasma, in dem die Senkung zu Beginn schneller stattfindet als im defibrinierten Blute, mit der Zeit eine relativ größere Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit zu beobachten ist als im Serum.

In Tabelle IV ist zum Vergleich ein normales weibliches Blut angegeben. Bei 90° sind die absoluten Senkungshöhen zu gering, um so deutliche Differenzen wie beim Blute aus Tabelle III nachweisen zu können, dagegen ist in diesem Beispiel die Abnahme des Senkungsvermögens in den schief gestellten Röhrchen, besonders bei 22,5°, deutlicher ausgesprochen.

Tabelle IV. Weibliches normales Menschenblut, CO_2 gesättigt, defibriniert.

Zeit in Minuten	90°		67½°		45°		22½°	
	Stunden nach Entnahme							
	2	26	2	26	2	26	2	26
20	0,5		1,0		3,0		4,0	
40	0,5	0,25	5,0	2,5	11,0	3,5	13,0	5,5
50	0,75		7,0	5,0	15,0		17,5	
80	1,25	0,5	12,0	7,5	24,0	14,0	27,0	19,0
110		0,75				19,5		26,5
140		1,5				26,0		32,0
170	2,25		23,0		35,0		40,0	
210	2,5	2,0	29,0	20,0	39,0	33,0	43,5	39,0
380	3,5		36,0		45,0		49,0	
890								
1160	10,0	5,0	44,0		51,0	46,0	55,0	51,0
1600		5,5				47,0		51,0

2 mm weite Röhrchen, Blutsäule 130 mm.

Die Veränderung der Senkungsgeschwindigkeit mit der Zeit ist bei den *verschiedenen Tierarten* eine verschieden große. Relativ gering ist sie z. B. beim Kaninchenblute, beträchtlich im Katzen- und Hundeblute; das menschliche und Schweineblut stehen in der Mitte.

In den weiteren Versuchen mußte zunächst entschieden werden, ob diese Abnahme des Senkungsvermögens auf die Schüttelwirkung zurückzuführen oder davon unabhängig ist. Zu diesem Zwecke wurden die gestandenen Blutproben geschüttelt und beobachtet, ob dadurch das gleich nach der Entnahme gemessene Senkungsvermögen wieder herzustellen ist.

In Tabellen V und VI sind zwei Versuche mit Schweineblut angegeben.

In Tabelle V wurde der Schüttelversuch mit 25 Stunden lang gestandenem Blute ausgeführt, wobei die Senkung gar nicht beeinflußt wird und die ursprüngliche Senkungsgeschwindigkeit nicht wieder hergestellt werden kann.

In Tabelle VI ist der Schüttelversuch mit 48 Stunden gestandenem Blute ausgeführt, wobei ebenfalls die ursprüngliche Senkungsgeschwindigkeit nicht wieder hergestellt werden kann, wenn auch in diesem Falle eine Zunahme des Senkungsvermögens bei 45 und 22,5° zu beobachten ist.

Tabelle V.

Weibliches Schweineblut (defibriniert).

Zeit in Min.	90°			67½°			45°			22½°		
	Stunden nach Entnahme											
	2	25	25[1])	2	25	25[1])	2	25	25[1])	2	25	25[1])
40	0			0						0,25		
60	0,20	0	0	0,2	0	0	0	0	0	3,5	0,25	0,25
80		0	0		0,2	0,20	1,5	0,5	0,5		0,75	0,75
100		0	0		0,2	0,20		0,75	0,5		1,75	1,75
120	0,20			1,5			6,5			11,0		
220	0,25			4,5			13,0			19,0		
350	0,5			7,5			20,0			26,0		
385		0	0,20		2,75	2,75		9,5	9,5		15,0	15,5
480	0,5			9,0			25,0			31,5		
960				15,0			33,0			40,0		
1350	2,0				6,5	6,5		22,0	22,0		28,0	28,0
1440		0,20	0,20									

2 mm weite Röhrchen, 130 mm lange Blutsäule.

Tabelle VI.

Weibliches Schweineblut (defibriniert).

Zeit in Min.	90°				67½°				45°				22½°			
	Stunden nach Entnahme															
	2	28	48	48[1])	2	28	48	48[1])	2	28	48	48[1])	2	28	48	48[1])
40	0				0,25				1,5				2,5			
60	0				1,0				4,0				6,0			
80	0,2	0,2	0	0	2,5	0,25	0,2	0,2	7,0	3,0	1,5	3,5	10,0	6,0	2,5	6.0
100	0,2				4,0				10,0				14,5			
120	0,25	0,2	0,2	0,25	6,0	2,0	0,5	0,5	14,0	8,0	4,5	7,0	18,0	11,5	7,5	14,0
180	0,5	1,0			12,0	4,0			25,0	14,0			28,0	18,0		
250	1,0		0,25	0,25	17,0		3,0	3,0	30,0		11,0	16,0	34,5		18,0	35,0
380	1,0				22,0				37,0				42,0			
510			0,5	0,5			10,0	10,0			23,0	27,0			31,0	47,0
1000		1,5				21,5				39,5				46,5		
1200	2,5				36,0	25,0			50,5	43,0			55,0			
1500	3,0		1,5	1,5	37,5	26,0	21,0	20,5	52,0	44,0	35,5	38,0	56,0		44,0	57,0

2 mm weite Röhrchen, 130 mm lange Blutsäule.

Eine ähnliche Unabhängigkeit der zeitlichen Abnahme des Senkungsvermögens von der Schüttelwirkung läßt sich im Hundeblute nachweisen. In einer vorangehenden Mitteilung konnten wir zeigen, daß beim männlichen Hundeblute die Schüttelwirkung *keine* Beschleunigung der Senkung, sondern eine *Abnahme* gegenüber O_2-Sättigung aufweist, und hier ergab sich, daß beim männlichen Hundeblute auch eine wesentliche Abnahme des Senkungsvermögens mit der Zeit zu beobachten ist.

[1]) Etwa 3 bis 4 Minuten geschüttelt.

Auch die Veränderung des Gasgehaltes des Blutes kann nicht als Ursache der zeitlichen Abnahme des Senkungsvermögens aufgefaßt werden, da diese Abnahme bei Blutproben, die mit verschiedenen Gasen gesättigt wurden, in derselben Art zu beobachten ist, wenn auch die Gase die Geschwindigkeit der Abnahme beeinflussen können.

Die weitere Aufgabe war, die Veränderung der Senkungsgeschwindigkeit mit der Zeit in den *Plasmen* im Vergleich mit dem Serum zu verfolgen.

In Tabelle VII sind in Plasmen durchgeführte Versuche angeführt. Neben Citrat, Oxalat und Fluoridzusatz wurden in vielen Fällen auch melaninsaures Natrium (*Wiechowski*) und in einigen Hirudin zugesetzt. Die Resultate der mit den beiden letztgenannten Zusätzen ausgeführten Versuche decken sich qualitativ mit den hier ausgeführten.

Pferdeblut weicht wieder in einigen Fällen ab, wobei die in den Plasmen noch stärker auftretende Agglutination sicherlich eine noch bedeutendere Rolle spielt als im Serum. Mit Ausnahme eines Falles von Kaninchenblut (Oxalatblut) bei 90° ist in allen Fällen eine sehr beträchtliche Abnahme der Senkungsgeschwindigkeit mit der Zeit im Oxalatplasma und Fluoridplasma und in fast allen Fällen [eine Ausnahme bildet nur ein Schwangerenblut[1])] im Citratplasma zu beobachten.

Von unserem großen Versuchsmaterial soll nur ein Beispiel (normales weibliches Menschenblut) für den quantitativen Ablauf der Änderungen des Senkungsvermögens gebracht werden (Tabelle VIII).

In allen Plasmen ist eine beträchtliche Abnahme der Senkung mit der Zeit zu beobachten[2]). Beim Oxalat- und Fluoridplasma wird der anfänglich bestehende Unterschied zwischen Plasma und Serum aufgehoben, ja es senken sich zu Beginn des Versuchs nach Stehen die roten Blutkörperchen im Plasma sogar langsamer als im Serum. Im Citratplasma ist dies nicht der Fall. Nach diesem Versuch ist also beim Stehen die Fibrinogenwirkung des Plasmas bei Oxalat- und Fluoridblut vollständig verschwunden.

Diese Erscheinung kann mit Hilfe der folgenden Übersichtstabelle näher untersucht werden (Tabelle IX).

---

[1]) Agglutination.

[2]) Zwischen den verschiedenen Plasmen sehen wir wesentliche Unterschiede im Senkungsvermögen. Zu Beginn des Versuchs ist die Senkung im Fluoridplasma am geringsten, im Citratplasma am größten. Diese Reihenfolge entspricht auch der Größe der zeitlichen Abnahme. Da wir beim Aufbewahren des Blutes innerhalb einiger Stunden nach der Entnahme keine wesentliche Veränderung der Senkung beobachten konnten, kann diese Parallelität nicht darauf zurückgeführt werden, daß die ersten Versuche 2 Stunden nach Entnahme ausgeführt wurden.

Tabelle VII.

	Ge-schlecht	Nach Stunden	Citratblut				Oxalatblut				Fluoridblut				Bemerkungen
			90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°	
Mensch .	♀	23					A	A	A	A	A	A	A	A	
„	♀	20					A	A	A	A					O₂-gesättigt
„	♀	20					A	A	A	A					CO „
„	♀	20					A	A	A	A					CO_2 „
„	♀	24	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	CO_2 „
„	♀	46	A	Z	Z	Z	A	A	A	A	A	A	A	A	CO_2 „ (Schwangere)
„	♀	22	A	A	{ A / =	Z / = }	A	A	A	A					CO_2 „
„	♀	42	A	Z	Z	=	A	A	A	A	A	A	A	A	H_2 „
„	♀	42					A	A	A	A					O_2 „ (Hypertonie)
„	♀	19½	Z	{ Z / =	Z	Z	A	A	A	A					CO_2 „ „ (Schwangere)
„	♂	44					A	A	A	A					
„	♂	44					A	A	A	A					O₂-gesättigt
„	♂	44					A	A	A	A					CO_2 „
„	♂	24					A	A	A	A	A	A	A	A	Venös
„	♂	65					A	A	A	A	A	A	A	A	CO_2-gesättigt
„	♂	23	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Schwein	♀	46	A	A	A	A									Tuberkulös
„	♀	23	=	A	A	A	A	A	A	A					
„	♀	23	A	A	A	A	A	A	A	A					
„	♀	43	A	A	A	A	A	A	A	A					
Hund . .	♀	23	=	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
„	♂	16		A	A	A									
„	♂	16	A	A	A	A									
„	♂	23½	A	A	A	A	A	A	A	A					
„	♂	47½	A	A	A	A	A	A	A	A					
Katze . .	♀	45½	A	A	A	A	A	A	A	A					CO_2-gesättigt
„	♀	40½	A	A	A	A	A	A	A	A					H_2 „
„	♁	23	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
„	♂	24					A	A	A	A					
„	♂	24	A	A	A	A	A	A	A	A					
„	♂	48	A	A	A	A	A	A	A	A					
Kaninchen .	♀	23					{ = / Z	A	A	A					O₂-gesättigt
„	♀	23					{ = / Z	A	A	A					CO_2 „
„	♀	50	{ A / =	A	A	A	{ A / =	A	A	A					
„	♂	22	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	
„	♂	27½	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	CO_2 „
Ochse .		22½					A	A	A	A					
Huhn . .	♀	4					A	A	A	A					
Ente . .	♂	22	A	A	A	A	A	A	A	A					
Pferd . .	♀	26	Z	A	A	A	Z	Z	Z	Z					
„	Wall.	20½	A	A		A	A	A	A	A					
„	♀	22½	Z	Z	Z	Z									Geschüttelt
„	♀	22½					A	A	A	A					
„	♂	22					A	Z	Z	A					
„	♂	24	A	A	A	A	Z	A	A	A	Z	A	A	A	Geschüttelt

A = Abnahme, Z = Zunahme, = Gleichheit des Senkungsvermögens, bezogen auf das Senkungsvermögen frisch nach der Entnahme.

Tabelle VIII.

Normales weibliches Menschenblut (CO_2-gesättigt).

Zeit in Min.	Citratplasma								Oxalatplasma							
	90°		67½°		45°		22½°		90°		67½°		45°		22½°	
	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.
20	1,75	1,0	20,0	7,0	37,0	7,5	44,0	25,0	1,0		14,0		25,0		26,0	
40	5	2,5	36,0	18,0	54,0	31,0	66,0	44,0	2,25	0,2	33,0	0,25	45,0	2,5	50,0	3,0
50	6,5	3,5	41,5	24,0	59,0	43,0		52,0	2,75		38,0		48,0		53,0	
80	12,0	5,0	51,0	30,0	65,0	51,0	70,0	57,0	6,0	0,5	47,0	4,0	53,5	11,0	57,5	15,0
110		7,5		37,0		57,0		60,0		0,5		7,0		16,0		22,5
140		9,0		41		60,0		63,0		0,5		10,0		21,0		29,0
170	27,0		64,0		73,0		74,0		16,0		56,0		59,0		63,0	
210	35,0	13,0	67,0	48,0	75,0	66,0	76,0	67,0	20,0	1,0	56,0	16,0	60,0	30,0	64,0	38,0
380	42,0		70,0	60,0	78,0	74,0	79,0	74,0	27,0		57,0		62,0		65,0	
1120	56,5	29,0	75,5	61,0	81,5	74,0	79,0	74,0	36,0	2,5	57,0	35,0	62,0	50,0	65,0	55,0
1860		35,0								3,25		43,0		50,0		55,0

Zeit in Min.	Fluoridplasma								Defibriniert							
	90°		67½°		45°		22½°		90°		67½°		45°		22½°	
	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.	2 St.	26 St.
20	0,75		5,0	0,25	16,0	0,5	23,0	0,75	0,25		1,5		4,5		5,5	
40	1,5		12,0	0,5	22,0	1,5	45,0	2,0	0,5	0,25	7,5		15,5	3,5	19,0	5,5
50	1,5		15,0	1,0	27,0		52,0				9,5		18,5		23,0	
80	1,75		24,0	1,5	39,0	6,0	62,0	9,0	1,25	0,5	18,0		29,0	14,0	35,0	19,0
110				3,0		10,0		16,0	1,5	0,75	24,0		35,0	19,5	40,0	26,5
140				5,0		13,5		27,0		1,5				26,0		32,0
170	3,0		38,0		55,0		73,0							33,0		39,0
210	3,5		43,5	10,0	60,0	20,0	75,0	45,0		2,0						
380	5,0		50,0		66,0		79,0		11,0		50,0		55,0		58,0	
1120	7,0		59,0	43,0	72,0	59,0	79,0	75,0		5,0				46,0		51
1860				60,0		64,0		75,0	27,0	5,5	54		60,0	48,0	63,0	51,0

Röhrchen 2 mm weit, Länge der Blutsäule 130 mm.

In Tabelle IX ist eine Reihe von Versuchen danach zusammengestellt:

1. Ob die Senkung im frisch untersuchten Plasma größer ist als im frisch untersuchten Serum.

2. Ob die Senkung in den gestandenen Plasmen größer oder kleiner ist als im frischen Serum.

3. Ob die Senkung in den gestandenen Plasmen größer ist als in den gestandenen Seren.

Zu 1. In allen Fällen, mit Ausnahme von Hühnerblut und einem Fluoridplasma (Hundeblut) ist die Senkung im Plasma zunächst größer als im Serum. (Die Dichte der Suspension ist immer ungefähr dieselbe.)

Zu 2. Die drei Plasmaarten verhalten sich sehr verschieden. Im Fluoridplasma ist es die Regel, daß die Senkung eine langsamere wird (ein Schwangerenblut verhält sich anders). Im Oxalatplasma tritt

Tabelle IX. Vergleich des Senkungs-

	Geschlecht	Zeit in Std.	Citratblut: Plasma und Serum, beide frisch				Citratblut: Plasma gestanden, Serum frisch				Citratblut: Plasma gestanden, Serum gestanden				[Überschrift abgeschnitten]: Plasma und Serum, beide frisch			
			90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°
Mensch	♀	24													g	g	g	g
„	♀	24													g	g	g	g
„	♀	23													g	g	g	g
„	♀	24	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♀	22½	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♀	46½	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♀	19½	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♂	24													g	g	g	g
„	♂	24	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Schwein	♀	46	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g				
„	♀	23	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♀	23	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♀	43	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Hund	♀	23	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♂	23	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♂	47½	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Katze	♀	40½	g	g	g	g	k	k	k	k	k	k	k	k	g	g	g	g
„	♂	24													g	g	g	g
Kaninchen	♀	23													g	g	g	g
„	♀	25	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
„	♀	49½	g	g	g	g	k	k	k	k	= k	k	k	g	=	=	g	g
Ochse		22½					=	=	=	=					=	=	k	k
Huhn	♀	45½													k	k	k	k

g = Senkung im Plasma größer als im Serum.
= Senkung gleich im Plasma wie im Serum.

vermögens in Plasma und Serum.

Oxalatblut								Fluoridplasma											
Plasma gestanden Serum frisch				Plasma gestanden Serum gestanden				Plasma und Serum beide frisch				Plasma gestanden Serum frisch				Plasma gestanden Serum gestanden			
90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°	90°	67½°	45°	22½°
g =	k g	k g	k g																
k	k	k g	k g																
= k	k	k	k	= k	k	k	k	g	g	g	g	k	k	k g	k g	= g	k g	k g	k g
k	k	k	k	= k		k =	k g	g	g	g	g	k	k	k g	k g		k	k g	= g
g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	k	k	k	k	k	k	k	k
g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	k	k	k	k	k	k	k	k
g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
= g	g	g	g	g	g	g	g		g	g	g	k g	k g	k g	k =	k	k g	k	k g
k g	k g	k g	k g					g	g	g	g	k	k	k	k				
g	g	g	g	g	g	g	g												
g	g	g	g	g	g	g	g												
g	g	g	g	g	g	g	g												
g	g	g	g	g	g	g	g	k g	k g	k g	k g	k g	k g	k g	k g	g	g	g	g
= k	k	k	k	g	g	g	g												
k	k	k	k	=	k	k	k												
k	k	k		k	k	k													
g	g	g	g	= k	g	g	g												
g	g	g	g	g	g	g	g												
g	g	g	g	g	g	g	g												
k	k	k	k	g	g	g	g												
k	k	k	k	=	=	g	g												
k	k	k	k	= k	g k	g k	g k												

k = Senkung im Plasma kleiner als im Serum.
k
g } = Senkung im Plasma im Beginn kleiner, am Ende größer als im Serum.

diese Erscheinung auch in einer ganzen Reihe von Fällen ein. Beim menschlichen Blute z. B. kommen beide Fälle, schnelleres und langsameres Sinken im Vergleich mit dem entsprechenden defibrinierten Blute, vor; das weibliche Blut zeigte sehr regelmäßig eine langsamere Senkung nach Stehen als im Serum (mit Ausnahme des Schwangerenblutes), ebenso tuberkulöses männliches Menschenblut. Jedenfalls wäre es von Wichtigkeit, daß diese Untersuchungen nach der diagnostischen Richtung hin weiter ausgearbeitet würden. Beim Citratblute ist in der Regel die Senkung auch im gestandenen Plasma größer als im Serum.

Zu 3. Wenn wir das gestandene Plasma mit gestandenem Serum vergleichen, so kommt es auch öfters vor, daß die Senkung im Serum größer ist, wenn auch nicht alle Fälle, in denen in frischem Serum gegenüber gestandenem Plasma dieser Unterschied vorhanden ist, sich auch gegenüber gestandenem Plasma ähnlich verhalten.

Dies spricht dafür, daß die Abnahme der Senkung im Plasma und im Serum mit der Zeit *nicht identische* Vorgänge sind, sondern daß im Plasma noch ein weiterer Faktor, mit dem Fibrinogen verbunden, wirksam ist.

Die langsamere Senkung könnte vielleicht mit einer schon von *Biernacki* gemachten Beobachtung erklärt werden, nämlich, daß die roten Blutkörperchen, wenn sie gesunken sind, kleiner sind als im Beginn des Versuches. Beobachtungen von *Lendertz*[1]) haben ergeben, daß beim Gerinnen des Blutes Flüssigkeit aus den roten Blutkörperchen austritt, sie werden also kleiner als im Plasma, eine Erscheinung, die außer der Fibrinogenwirkung auch eine Verlangsamung der Senkung verursacht.

Die naheliegendste Annahme für die Abnahme des Senkungsvermögens mit der Zeit in den Plasmen ist, daß die Fibrinogenwirkung zum Teil oder ganz aufgehoben ist. Die besonders große Wirkung des Fluorids weist darauf hin, daß es sich dabei um eine Flockung handelt[2]). Fluorid flockt in größeren Konzentrationen ja sogar Globulinlösungen. Diese Flockung muß aber nicht sichtbar werden, sondern es genügt eine kolloidale Zustandsänderung, um die „Klebewirkung" des Plasmas zu vermindern. Am schwächsten ist dabei Citrat, am stärksten Fluorid wirksam. Damit ist aber auch wahrscheinlich gemacht, daß zwischen der makroskopischen Fibringerinnung und der Veränderung des Fluorid-, Oxalat-, ja sogar Citratplasmas in der Zeit kein qualitativer Unterschied besteht, sondern daß es nur nicht zur

[1]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **140**, 1922.

[2]) Betreffs des Zusammenhangs von Wärmeflockung des Fibrinogens und Gerinnung vgl. *E. Wöhlisch*, Klin. Wochenschr. **1923**, S. 278.

sichtbaren Gerinnung und Faserstoffausscheidung kommt, wenn wir Citrat, Oxalat oder Fluorid zusetzen. Die Blutproben verändern sich (nach dem Verhalten der Senkung zu schließen) in der Richtung des defibrinierten Blutes, und diese Veränderung ist wahrscheinlich durch eine *unsichtbare Gerinnung* verursacht. Dabei spielen die roten Blutkörperchen eine sehr wesentliche Rolle; es konnte nämlich gezeigt werden, daß auch ihre Oberfläche durch die gerinnungshemmenden Substanzen beeinflußt wird, wobei es sich wahrscheinlich wieder um das Fibrinogen handelt. Diese Erscheinungen sind einer weiteren Untersuchung vorbehalten, in der wir quantitativ die Wirkung der verschiedenen gerinnungshemmenden Substanzen auf die Sedimentierung untersucht haben.

Die Senkung der roten Blutkörperchen erweist sich als ein sehr empfindlicher Indikator für zeitliche Veränderungen des Blutes in vitro. Sowohl im Serum wie im Plasma ist die Abnahme des Senkungsvermögens die Regel. In den verschiedenen Plasmen und im Serum ist diese Abnahme quantitativ verschieden, wie auch für die einzelnen Tierarten mehr oder weniger charakteristische Unterschiede nachgewiesen werden konnten.

Die zeitliche Veränderung des Plasmas ist zum Teil auf die Veränderung des Fibrinogens zurückzuführen, wobei es sich wahrscheinlich um Flockungsvorgänge handelt, was für den Zusammenhang zwischen der Gerinnung des Blutes und den Veränderungen des Plasmas in vitro spricht.

Über Kalkbindung durch tierische Gewebe.

Von

Raphael Ed. Liesegang.

(Aus dem Institut für physikalische Grundlagen der Medizin, Universität Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1923.)

Gegen die weitgehende Anwendung der *Pfaundler*schen Kalkfängertheorie durch *Freudenberg* und *György* hat *Rabl*[1]) eingewendet, daß im verkalkten Gewebe ganz erheblich viel mehr Kalk enthalten ist, als vom Eiweiß chemisch gebunden sein kann. Scheinbar unabhängig davon finden *Freudenberg* und *György* jetzt selber diese Schwierigkeit für ihre Theorie. Sie suchen dieselbe aber trotzdem zu halten[2]), indem sie erklären, daß zunächst eine geringe Menge einer Calciumphosphat-Proteinverbindung entstehe, welche dann aber unter Freiwerden von Protein zerfalle. Letzteres solle dann von neuem als Kalkfänger dienen, daraus entstehe abermals die Calciumphosphat-Proteinverbindung usf. Sie stützen sich dabei immer wieder auf ihre beiden Grundversuche: Werden Knorpelstücke zuerst in einer $CaCl_2$—, dann in Phosphatlösung gebadet, so werden sie so reich an Calciumphosphat, daß sie weiß, undurchsichtig, spröde, sehr hart, also von knochenähnlichem Charakter sind. „Liegt eine bloße Imprägnation vor, die dadurch zustande kommt, daß sich das Kolloid zuerst mit der Ca-, dann mit der Phosphatlösung imbibiert, so muß die Reihenfolge gleichgültig sein, in welcher man die Lösungen einwirken läßt". Dagegen soll nun das negative Resultat des zweiten Versuchs sprechen, bei welchem erst die gleiche Phosphat-, dann die gleiche Ca-Lösung einwirkt[3]).

Dieser Schluß ist falsch, weil der zweite Versuch unter falschen Bedingungen angestellt worden ist. Beim ersten Versuch konnte das Phosphat in den mit Ca imprägnierten Knorpel dann eindringen, wenn das Phosphat eine höhere molekulare Konzentration als das $CaCl_2$ hatte. Alle Versuche über Diffusion mit gleichzeitigem chemischen Umsatz zeigen, daß das Umgekehrte fehlschlagen mußte. Zwar findet auch hier Calciumphosphatbildung statt, jedoch nicht innerhalb des Knorpelgewebes, sondern in der umspülenden Flüssigkeit. Denn das $CaCl_2$ diffundiert — wenigstens in einer gewissen Menge — hinaus. Der Fehler liegt darin, daß bei beiden

---

[1]) *C. R. H. Rabl*, Klin. Wochenschr. 2, 1798, 1923; Virchows Arch. **245**, 542, 1923.

[2]) *E. Freudenberg* und *P. György*, diese Zeitschr. **142**, 407, 1923.

[3]) *Dieselben*, ebendaselbst **118**, 52, 1921.

Versuchen die Salze in gleichen Konzentrationen benutzt wurden. Beim zweiten hätte die $CaCl_2$-Lösung stärker sein müssen. Daß unter diesen Verhältnissen auch bei Gelatine-, Agar-, Kieselsäuregallerten eine außerordentlich dichte Imprägnation mit Calciumphosphat stattfinden kann, habe ich früher zeigen können[1]).

Entsteht beim ersten Versuch durch die einmalige Einwirkung die reiche Menge an Calciumphosphat, so spricht das gegen die neue Theorie des Zerfalls der Eiweißkomplexverbindung.

Zugunsten der letzteren soll auch die verminderte Quellbarkeit des Knorpels sprechen. Denn „ein unlöslicher, im Gewebe rein mechanisch eingelagerter, anorganischer Niederschlag dürfte dasselbe in seiner Quellbarkeit nicht hemmen". – Nun bedingt aber ein dichter Niederschlag von Calciumphosphat, welcher in einer Gelatinegallerte entstand, eine starke Schrumpfung derselben, gleichgültig, ob das Calcium oder Phosphat zuerst einwirkte[1]). Die Quellungsverhältnisse sprechen also auch nicht für die Kalkfängertheorie.

Schließlich wird die eigenartige Verteilung des künstlichen Calciumphosphatniederschlags im Knorpel zugunsten der letzteren ausgeführt. Aber die sehr feine Verteilung war von vornherein wegen des gallertigen Mittels zu erwarten. Bei sehr vielen anderen Niederschlägen und Gallerten wäre sie auch gefunden worden. Fand *Eden*[2]) bei einem ähnlichen Versuch sogar eine Nachahmung der mikroskopischen Struktur von sklerotischen Knochen, so kann das teilweise durch rhythmische Fällungen des Calciumphosphats bedingt sein, welche auch in Gelatine- und Agargallerte leicht auftreten.

Das Verhältnis des Calciumphosphats zum Carbonat = 7 : 1 im Knochen wollen *Freudenberg* und *György* erklären: „aus der Wirkung des Eiweißes als Säure gegenüber den von den zirkulierenden Säften herbeigeführten Ionen". Viel näher liegt es, daran zu denken, daß bei der Umsetzung zwischen einem neutralen löslichen Calciumsalz und einem neutralen Alkaliphosphat dreibasisch-phosphorsaurer Kalk ausfällt, und in der Flüssigkeit einbasisch phosphorsaurer Kalk bleibt. $4\,K_2HPO_4 + 3\,CaCl_2 = Ca_3(PO_4)_2 + 6\,KCl + 2\,KH_2PO_4$. Letzteres wirkt aber wie eine Säure auf das Natriumbicarbonat und treibt Kohlensäure daraus aus. Das bedeutet nicht allein Verminderung an Carbonat, sondern auch vermehrte Bildung von Tricalciumphosphat.

---

[1]) *R. E. Liesegang*, Beitr. z. e. Kolloidchemie d. Lebens. 1. Aufl. 1909, S. 56.

[2]) *R. Eden*, Klin. Wochenschr. 2, 1798, 1923.

Studium der Eiweißkörperkoagulation in Tropfen.

IV. Mitteilung:

Über den Einfluß der Qualität von Eiweißkörpern und Fällungsmitteln auf die Fällung.

Von

L. Čikánek, J. Havlík und **F. Kubánek.**

(Aus dem chemischen Institut der tierärztlichen Hochschule in Brünn, Tschechoslowakei.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

In dieser Arbeit verwendeten wir die *Bečka*sche Tropfenmethode zur Prüfung der Koagulation verschiedener Eiweißlösungen mittels chemischer Fällungsmittel in Wasser, und zwar allein und in Gegenwart diverser Salze.

Wie schon aus den vorhergehenden Untersuchungen ersichtlich ist, ändert sich die gefällte Fläche, die nach *Bečkas* Tropfenmethode aus verschiedenen Eiweißlösungen entsteht, mit der Qualität des Fällungsmittels, des Eiweißstoffes und des Verdünnungsmittels.

Unsere Versuche betreffen die in Wasser löslichen Stoffe, welche in Eiweißlösungen eine Trübung verursachen können. Die Stoffe, welche überhaupt keine Trübungen hervorgerufen hatten, wurden von vornherein festgestellt und ausgeschieden; mit denen aber, welche koagulierten, wurden auf 140 Feldern Experimente gemacht. Für die erste Reihe wurde ein möglichst konzentriertes Fällungsmittel genommen, welches in geometrischer Reihe mit destilliertem Wasser oder in bestimmten Fällen mit Salzlösungen verdünnt wurde. Dasselbe Verfahren wurde auch beim Verdünnen der Eiweißstoffe (X-Richtung) eingehalten, welche wegen der einfacheren Manipulation aus einem Pferdeserum genommen wurden, wobei die Isolierung nach der üblichen Methode erfolgte, oder man benutzte das Serum direkt.

Bei den Versuchen wurde eine Serumlösung von einem Pferde mit folgendem Status benutzt: ein Wallach, 8 Jahre alt, krank an Nephritis chronica, 4,82 Proz. Eiweißstoff, 6,1 p_H. Zur Koagulation wurden Lösungen folgender Salze genommen: Kupfersulfat, Cadmium-

nitrat, Bariumchlorid, Sublimat, Aluminiumchlorid, saures Natriumphosphat, Ferrosulfat, Ferrisulfat, Ferrichlorid, Kaliumaluminiumsulfat und Chromkaliumsulfat; von den anorganischen Säuren: Chlorsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Chromsäure, Borsäure, Phosphorwolframsäure; von den organischen: Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Milchsäure und Thiomilchsäure, Glykokoll, Alanin, Brenzweinsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Sulfosalicylsäure, Naphtholsulfonsäure, Pikrinsäure, Phenol, Resorcin, Pyrogallol, Mekonsäure, Amidobenzoesäure (o. m. p.), Tannin, Acetylosalicylsäure und Tyrosin.

Es ist zu bemerken, daß die Fällungsmittelqualität so scharf zum Ausdruck kommt, daß man immer von einem Typus der gefällten Fläche sprechen kann (Abb. 1).

Der Typus $Hg^{\cdot\cdot}$ zeichnet sich durch ein gleichmäßiges Abnehmen der Fällung in beiden Richtungen (des Fällungsmittels und des Proteins) aus, so daß sich ein Quadrat bildet: I A. — Der Typus $Cu^{\cdot\cdot}$ ($Cd^{\cdot\cdot}$) läßt sich durch einen mehr oder weniger gedehnten Rhombus darstellen: I B. — Die höchste Fällung erfolgt nur in gewissen Zonen, wo ein bestimmtes Verhältnis zwischen dem Fällungsmittel und dem Eiweißstoff besteht. (Im konzentrierten Fällungsmittel löst sich die Trübung gänzlich auf, wenn auch der Eiweißstoff konzentriert ist.) — Der Typus $Fe^{\cdot\cdot\cdot}$ ($Al^{\cdot\cdot\cdot}$) äußert sich durch einige Maxima der Fällungskraft in bestimmten Konzentrationen: I C. — Der Typus der Säuren mit einer großen Dissoziation: I D ist entgegengesetzt dem Typus der Amino- und der zweibasischen Säuren: I E.

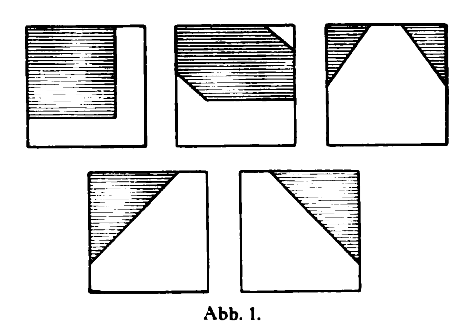


Abb. 1.

Obwohl die Zahlenverhältnisse von Typen der gefällten Flächen (Grade der Verdünnung) nach der Mannigfaltigkeit der Proteine schwanken, konnte man wahrnehmen, daß dasselbe Fällungsmittel in gleicher Eiweißart (Albumin und Globulin) von derselben Tiergattung unter gleichen physiologischen Bedingungen seinen Typus behält. Diese Beständigkeit kann zum qualitativen Nachweis chemischer Stoffe dienen.

Sobald man Eiweißstoffe einer anderen Tiergattung oder Eiweißstoffe kranker Tiere anwendet, ändert sich bei manchen Fällungsmitteln wesentlich der Umfang, manchmal auch der Typus der gefällten Fläche, auch wenn der Versuch unter denselben Bedingungen ausgeführt wird. Diese Erscheinung konstatierten wir bei Experimenten mit einem Serum vom Pferde mit folgendem Status: eine Stute,

18 Jahre alt, schlecht genährt, krank an Ascites; das Blutserum enthielt 6,70 Proz. Eiweiß und 6,4 p_H. Das dritte Pferd war ein Wallach, 8 Jahre alt, gut genährt, mit Hämoglobinämie behaftet; das Blutserum enthielt 5,90 Proz. Eiweiß, 6,3 p_H. Das vierte Pferd war eine Stute, 16 Jahre alt, gut genährt, mit Tetanus behaftet; das Serum enthielt 7,05 Proz. Eiweiß. Die Experimente wurden mit denselben Fällungsmitteln und unter denselben Bedingungen durchgeführt wie im ersten Falle.

I.

Um festzustellen, was für einen Einfluß die chemische Struktur der Fällungsmittel auf die Fällung ausübt, benutzten wir äquimolekulare Lösungen organischer Verbindungen.

Laut Abb. 2 wurden geprüft: Essigsäure, Glykokoll, Mono-, Di- und Trichloressigsäure, Bromessigsäure. Man sieht, daß die Fällungskraft bei der Essigsäure gleich Null ist, beim Glykokoll, bei der Bromessigsäure und Chloressigsäure steigt, den höchsten Punkt bei der Dichloressigsäure erreicht und bei der Trichloressigsäure wieder sinkt. Es folgt daraus, daß Chlor in einem Molekül eine größere Fällungskraft als Brom besitzt; mit dem Eintritt des zweiten Chloratoms potenziert sich dieselbe, das dritte Atom wirkt jedoch schon abschwächend. (Jodderivate waren nicht erhältlich.)

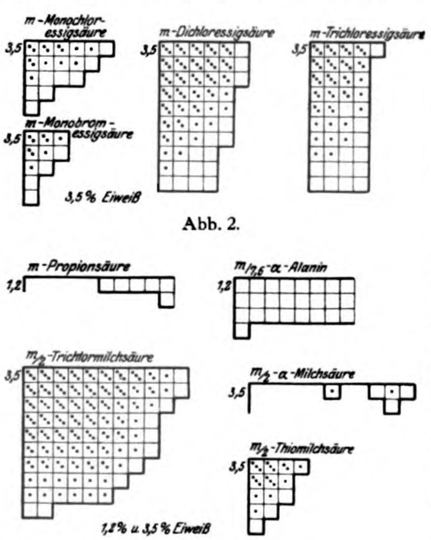


Abb. 2.

Abb. 3.

Laut Abb. 3 wurde eine weitere Reihe geprüft: die Propionsäure, α-Milchsäure, α-Thiomilchsäure und Trichlormilchsäure. Die Propionsäure fällt überhaupt nicht, α-Milchsäure schwach, α-Thiomilchsäure mehr, und die Trichlormilchsäure zeigt eine eminente Fällbarkeit. Das bestätigt das vorhergehende Ergebnis, daß Chlor im Molekül ein hervorragender Fällungsfaktor ist. (Leider war es uns unmöglich, die Mono- und Dichlormilchsäure zu erhalten.)

Abb. 4. Die Wirkung von Phenol, Resorcin und Pyrogallol beweist den steigenden Einfluß von OH-Gruppen, der bei drei Hydroxylen am stärksten ist. Aus der Arbeit *Bečka* und *Šinkora*, Mitteilung III, ersieht man, daß die Lage der OH-Gruppen für die

Fällung nicht entscheidend ist. (Geprüft am Resorcin und Pyrocatechin.)

Abb. 5. Durch den Eintritt der COOH- und noch mehr der SO_3H-Gruppe in das Molekül steigt die Fällungskraft bedeutend.

Abb. 6. Die NO_2-Gruppe weist eine starke Fällungskraft auf, die der Wirkung von Chlor ähnlich ist. Die Akkumulation dieser Gruppe verstärkt sie noch mehr.

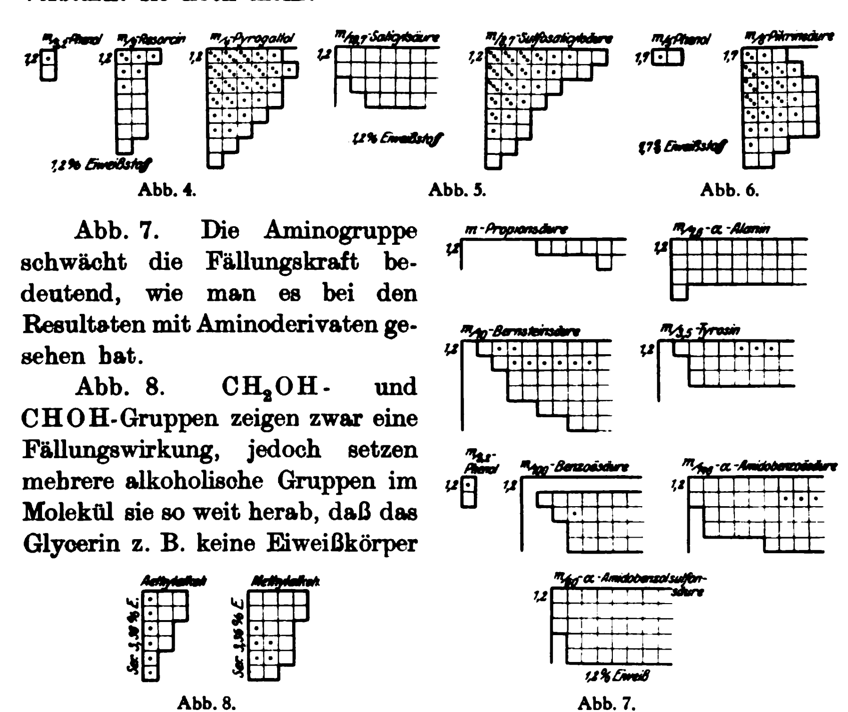


Abb. 4. Abb. 5. Abb. 6.

Abb. 7. Die Aminogruppe schwächt die Fällungskraft bedeutend, wie man es bei den Resultaten mit Aminoderivaten gesehen hat.

Abb. 8. CH_2OH- und CHOH-Gruppen zeigen zwar eine Fällungswirkung, jedoch setzen mehrere alkoholische Gruppen im Molekül sie so weit herab, daß das Glycerin z. B. keine Eiweißkörper

Abb. 8. Abb. 7.

mehr fällt. Diese Erfahrung bestätigten wir durch eine lange Reihe von Versuchen mit Eiweißlösungen, mit gleichen Teilen Glycerin gemischt, und wir benutzten jetzt das Glycerin als ein Konservierungsmittel für Eiweiße.

II.

Der Einfluß des Verdünnungsmittels auf die Fällung wurde schon eingehend von *Bečka* und *Šinkora* studiert; wir begnügten uns mit der Feststellung der konstatierten Tatsachen.

III.

Der dritte Faktor der Eiweißkoagulation, welcher sich durch die Tropfenmethode mit einer ungewöhnlichen Genauigkeit verfolgen läßt, ist der gefällte Eiweißstoff. Proteine verschiedener Aussalzbarkeit

und chemischer Zusammensetzung unterscheiden sich durch ihre Tropfendiagramme wesentlich voneinander, auch wenn sie von derselben Tiergattung stammen.

In unseren Versuchen verfolgten wir die Fällungsfähigkeit der Albumine und Globuline im Vergleich mit dem ursprünglichen Pferdeserum. Die Lösungen dieser Eiweiße, mit $MgSO_4$ völlig, ev. mit $(NH_4)_2SO_4$ halb gesättigt, wurden vor dem Gebrauch mit destilliertem Wasser verdünnt, während dem Serum dasselbe Quantum von Salz [$MgSO_4$ oder $(NH_4)_2SO_4$] beigemengt wurde.

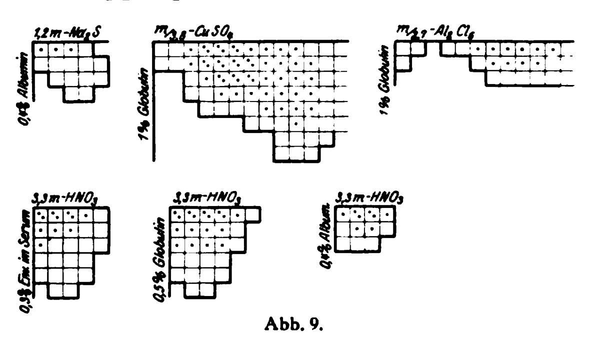


Abb. 9.

Albumine in 1proz. Lösung wurden mit Na_2S, KOH, KCN koaguliert, während bei den Globulinen jede Wirkung ausblieb. Kuprisulfat, Cadmiumnitrat, Aluminiumchlorid und sekundäres Natriumphosphat fällen nur Globuline, Albumine dagegen nicht (Abb. 9).

Bei den Versuchen, wo sowohl Globuline als auch Albumine gefällt wurden, weisen die Globuline eine größere Fällungsfähigkeit aus, d. h. sie werden in schwachen Konzentrationen des Eiweißes und des Fällungsmittels stark gefällt.

IV.

Im letzten Teile dieser Abhandlung soll noch auf die Veränderungen der Koagulation der Eiweiße im Serum bei diversen Krankheiten hingewiesen werden, wie man sie bei Experimenten mit Seren, die den verschieden kranken Pferden entnommen wurden, beobachten konnte. Dies geschah bei vier Krankheiten: Nephritis chronica, Ascites, Hämoglobinämia und Tetanus. Die Seren wurden mit etwa 50 Stoffen gefällt, wovon die meisten der Fällungsmittel ihren Typus bewahrten, immerhin fanden sich aber einige, deren Diagramme durch den Einfluß der Krankheiten sich bedeutend unterschieden. Von unseren Fällungsmitteln können als solche bezeichnet werden: Eisensulfat, Pyrogallol und Tannin (Abb. 10).

Es liegt uns fern, aus diesen einigen Versuchen auf die durch Krankheiten hervorgerufenen Veränderungen an Eiweißkörpern schließen

zu wollen; denn auch andere Umstände (verschiedene Ionen: H˙, Na˙, Cl′ usw., verschiedene Stoffe: Harnstoff und Reststickstoff) können

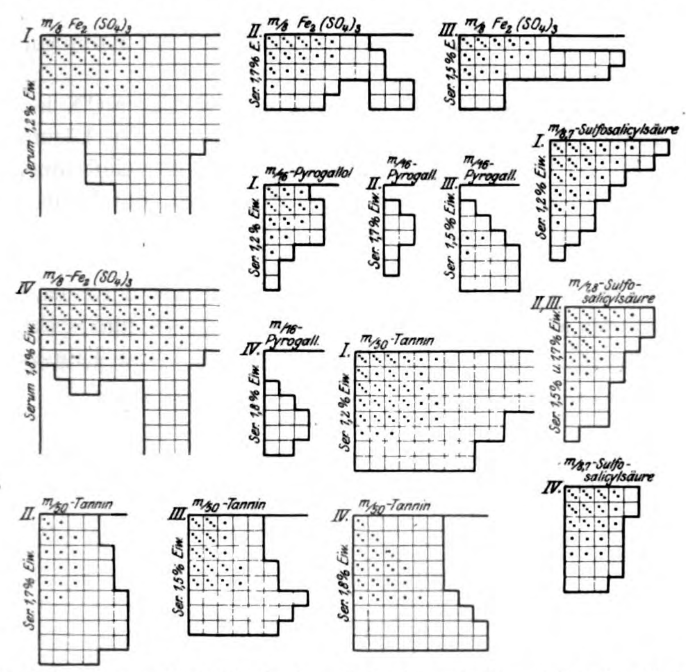


Abb. 10. I. Pferdeserum: Nephritis chronica. II. Ascites. III. Hämoglobinämia. IV. Tetanus.

dabei eine Rolle spielen. Es hat jedoch den Anschein, als ob diese Wahrnehmungen eine praktische Bedeutung für klinische Diagnosen haben können.

Zusammenfassung.

1. Neutralsalze (Hg˙˙), Salze der zweiwertigen Metalle (Cu˙˙, Cd˙˙), der dreiwertigen Metalle (Fe˙˙˙, Al˙˙˙), Säuren mit einer großen Dissoziation, Aminosäuren und Dicarbonsäuren haben ihre eigenartigen Typen der gefällten Flächen.

2. Die Tropfenmethode kann zur Analyse von chemischen Stoffen benutzt werden.

3. Halogene, Hydroxylgruppe (OH), Sulfongruppe (SO_3H), Nitrogruppe (NO_2) im Molekül des organischen Fällungsmittels erhöhen die Fällungskraft desselben; die Aminogruppe (NH_2) dagegen erniedrigt sie.

4. Die aliphatischen Alkohole zeigen eine gewisse Fällungskraft, dieselbe sinkt jedoch mit der Zahl der alkoholischen Gruppen im Molekül, so daß Glykol keine Fällungswirkung hat und das Glycerin

sogar die Fällbarkeit des Blutserums gegen verschiedene Mittel unverändert läßt; es kann daher als ein konservierendes Mittel der Eigenschaften der Proteine verwendet werden.

5. Der Einfluß des Verdünnungsmittels auf die Fällungsfähigkeit der Eiweißstoffe ist sehr groß.

6. Mit bestimmten Lösungen von Na_2S, KOH, KCN lassen sich die Albumine, aber nicht die Globuline ausfällen. Die Lösungen von $CuSO_4$, $Cd(NO_3)_2$, $AlCl_3$ und Na_2HPO_4 fällen die Globuline, jedoch nicht die Albumine. Die übrigen Fällungsmittel, die beide Proteine fällen, haben im allgemeinen eine größere Wirkung auf die Globuline als auf die Albumine.

7. Die Seren von Pferden, die mit Nephritis chronica, Ascites, Hämoglobinämia und Tetanus behaftet sind, gaben eigenartige Typen der gefällten Flächen mit Ferrosulfat, Pyrogallol und Tannin.

Literatur.

Die vorigen Mitteilungen in dieser Zeitschr. **187**, Heft 4/6; **188**, Heft 4/6. Mitteilung II und III. Publikace vys. šk. zvérolék. v. Brně 1923, Nr. 9, 10.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 58.

Prüfung der Frage von giftigen Stoffen im Serum schilddrüsenloser und parathyreopriver Tiere mit Hilfe des respiratorischen Grundumsatzes.

Von

Ken Jino.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Neben der Lehre, daß die Organe mit innerer Sekretion dazu bestimmt seien, an den Organismus Stoffe abzugeben, welche regelnd in die Funktionen näher oder ferner liegender Organe eingreifen, behauptet sich noch die Ansicht, daß die sogenannten Organe mit innerer Sekretion auch der Entgiftung dienen können. Diese Auffassung ist nicht unberechtigt, wenn man an die bemerkenswerten Erscheinungen denkt, welche infolge der Entfernung gewisser Organe eintreten. Die Beobachtung der schweren Symptome, welche nach Entfernung der Glandulae parathyreoideae oder der Nebenniere eintreten können, lassen die Meinung, daß es sich hierbei um eine Vergiftung des Organismus handle, als wohl diskutierbar erscheinen. Die Lehre von den entgiftenden Funktionen der Organe mit innerer Sekretion wird aber auch für Organe vertreten, für die nach dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse die innere Sekretion als feststehend gilt und wo von der Mehrzahl der Autoren die Zurückführung auf ein Vorhandensein, Fehlen oder Übermaß vielleicht auch Abartung der inneren Sekretion eine genügende Erklärung für alles Beobachtbare gibt. Das Gesagte bezieht sich auf die Schilddrüse. Die Behauptung, daß die Schilddrüse eine entgiftende Funktion ausübe, daß also die Ausfallssymptome bei ihrem Fehlen auf einem oder mehreren im Organismus nicht mehr

durch die Schilddrüse entgifteten Giften beruhen, müßte sich natürlich auf beweisende Experimente stützen. In der neueren Literatur gibt es aber nur noch eine einzige sehr interessante Versuchsreihe, welche im Sinne der Entgiftungslehre spricht, und das ist eine von *P. Trendelenburg*[1]) stammende. *Trendelenburg* bediente sich der *Reid-Hunt*schen Acetonnitrilreaktion, welche damals im Jahre 1910 mit für die beste Methode galt, um wirksame Schilddrüsensubstanz nachzuweisen. Dieselbe beruht bekanntlich darauf, daß Mäuse nach Zufuhr von wirksamen Schilddrüsenstoffen gegen die Vergiftung mit Acetonnitril resistenter werden können. *Trendelenburg* fand, daß mit dem Blute normaler Katzen die Acetonnitrilreaktion nicht gelingt, d. h. nach Verfütterung von Normalblut werden Mäuse nicht resistenter gegen die Vergiftung mit Acetonnitril. Nach Entfernung der Schilddrüse fand *Trendelenburg* auffallenderweise, daß mit dem Blute der schilddrüsenlosen Katzen die Acetonnitrilreaktion gelang, woraus er den Schluß zog, daß wegen Fehlens der Schilddrüse die Speicherung des die Acetonnitrilreaktion verursachenden Körpers in der Schilddrüse nicht mehr stattfinden könne, dieser vielmehr im Organismus kreise. Wenn dieses Ergebnis zuträfe, so würde es, wie *Trendelenburg* ausführt, besagen, daß der Stoff, der nur in vollwertigen Schilddrüsen auffindbar ist, ein Gift sei, welches von der Schilddrüse zu Entgiftungszwecken gespeichert werde. Die zahlreichen Erfahrungen der letzten Jahre machen zwar diese Deutung nicht wahrscheinlich, auch ist die *Reid-Hunt*sche Reaktion durch weit bessere ersetzt: aber immerhin verdient die Versuchsreibe von *Trendelenburg* noch einmal überprüft zu werden. Diese Überprüfung muß natürlich mit neueren und in ihren Grundlagen durchsichtigeren Methoden ausgeführt werden. Mit solchen Methoden hat man sich vielfach im Berner physiologischen Institut beschäftigt, und die Erfahrungen, die dort gewonnen worden sind, haben zu der Einsicht geführt, daß die Methode der Prüfung der Sauerstoffempfindlichkeit die Methode des Grundumsatzes und die passend ausgeführte Methode von *Laeven-Trendelenburg* wohl die zuverlässigsten sind. Aus diesem Grunde folgte ich der Anregung von Prof. *Asher*, um unter seiner Leitung die Frage, ob nach Schilddrüsenentfernung biologisch wirksame Stoffe im Organismus kreisen, zu prüfen, zugleich aber auch, gewissermaßen als Kontrolle, die Frage, ob nach Entfernung der Glandulae parathyreoideae im Blute nachweisbare differente Stoffe vorhanden sind, mit zu untersuchen. Was die letzteren Organe anlangt, so ist jetzt die Meinung vorherrschend, daß die Tetanie auf der Dimethylguanidinvergiftung, beziehentlich, nach neuesten Erfahrungen von *Carlson* und *Luckhardt*, auf Ver-

[1]) *P. Trendelenburg*, diese Zeitschr. **29**, 396, 1910.

giftung mit mehreren Eiweißabbauprodukten beruhe. Für diese Anschauung gibt es auch eine Reihe von beachtenswerten Stützen. Die Frage, ob im Blute von Tieren, die sich gerade im Tetanieanfall befinden, ein Gift nachweisbar ist, ist mehrfach untersucht worden, so z. B. im Berner physiologischen Institut durch *E. L. Backman*[1]). *Backman* entnahm im Tetanieanfall Blut von Kaninchen und prüfte dessen Wirksamkeit auf den überlebenden Kaninchendarm. Mit dieser Methode war er nicht in der Lage, eine Giftwirkung festzustellen.

Die Methode, deren ich mich bediente, war die Untersuchung des Einflusses parenteraler Seruminjektion auf den respiratorischen Grundumsatz von Ratten. Wie schon oben bemerkt wurde, ist der Grundumsatz ein sehr feines Reagens auf Schilddrüsenstoffe wie auch auf Stoffe, die eine biologische und chemische Beziehung zur Schildrüse haben. Neben der Feinheit und Zuverlässigkeit der Methode kommt hinzu, daß gerade Ratten, die ich zu meinen Versuchen benutzt habe, Tiere sind, die ein ausgeprägtes Reaktionsvermögen in den hier in Betracht kommenden Stoffwechselvorgängen besitzen. Die von mir benutzte Methode der Untersuchung des respiratorischen Grundumsatzes von Ratten war die von *Asher* und seinen Mitarbeitern vielfach gebrauchte und mehrfach beschriebene.

Die parenterale Injektion einer so komplexen Flüssigkeit wie Serum bringt in die Methode neue Momente hinein, die berücksichtigt werden müssen. Die mir gestellte Aufgabe besteht darin, zu untersuchen, ob infolge der Versuchseingriffe Stoffe im Serum vorhanden sind, welche auf den respiratorischen Grundumsatz eine Wirkung besitzen. Wenn solche Stoffe auftreten, so wird man nach dem augenblicklichen Stande unseres Wissens in erster Linie an verhältnismäßig einfache Stoffe zu denken haben und nicht an Eiweiße oder andere Körper mit antigenen Eigenschaften. Nun enthält aber das Serum, insbesondere artfremdes Serum, wie ich es verwenden mußte, Eiweiß und antigene Stoffe, die durchaus nicht indifferenter Natur sind. *Amstad* hat in einer im Druck befindlichen Arbeit im Berner physiologischen Institut nachweisen können, daß eine so geringe Menge wie 1 bis 2 ccm artfremdes Serum, intravenös dem Kaninchen injiziert, den Grundumsatz desselben merklich steigert, während die gleiche Menge artgleichen Serums diesen Einfluß nicht besitzt. Diese Tatsache war bei meiner Methodik zu berücksichtigen.

Ich habe in erster Linie den Grundumsatz der zu meinen Versuchen dienenden normalen Ratten festgestellt. Es bedarf mehrerer Tage der Angewöhnung, bis man den konstanten Wert des Grundumsatzes nüchterner ruhender Ratten erhält. In den später folgenden Tabellen I bis IV sind die hier in Betracht kommenden Werte mitgeteilt. Als Mittelwert aller Versuche ergab sich ein Sauerstoffverbrauch

---

[1]) *E. L. Backman*, Zeitschr. f. Biol. **67**, 353, 1917.

pro Kilogramm Körpergewicht und pro Stunde von 2,484 ccm und eine Kohlensäurebilanz von 2,579 ccm.

Nach Feststellung des Grundumsatzes ging ich dazu über, den Einfluß von parenteral zugeführtem Serum von Kaninchen auf den Grundumsatz zu untersuchen. Als Weg der parenteralen Zufuhr wählte ich die intraperitoneale Injektion. Dieselbe ist bei der Ratte leicht durchführbar. Sie hat außerdem den Vorzug, daß die Eiweißresorption aus der Peritonealhöhle sehr langsam vor sich geht und daß man auf Grund anderweitiger Erfahrungen weiß, daß die antigene Eigenschaft von artfremdem Serum auf diesem Wege in viel milderer Weise zum Ausdruck gelangt als bei intravenöser Injektion. Das Serum gewann ich von normalen Kaninchen aus dem Ohre derselben steril, indem ich das Blut in sterilen Gefäßen auffing und durch Zentrifugieren die Trennung von Blutkuchen und Serum beschleunigte. Der Erfolg der Seruminjektion wurde am Tage der Injektion selbst sowie in den nachfolgenden 2 bis 7 Tagen untersucht.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe lege ich in den Tabellen V und VI nieder, sowie in den später folgenden Kurven. Es zeigt sich bei beiden zum Versuche herangezogenen Ratten als Erfolg der parenteralen Injektion von normalem Kaninchenserum im Durchschnittswerte der Kohlensäurebildung und des Sauerstoffverbrauchs eine kleine Steigerung. Dieselbe beträgt für die Kohlensäurebildung etwas mehr als für den Sauerstoffverbrauch. Die Steigerung ist am größten am zweiten bis vierten Tage nach der Injektion, wenn 1 ccm Serum injiziert wird; bei Injektion von 2 ccm Serum kann der größte Anstieg am Tage der Injektion erfolgen. Die hier mitgeteilten Ergebnisse decken sich mit den Erfahrungen, welche *Amstad* an Kaninchen gemacht hat, die in der *Jaquet*schen Respirationskammer untersucht wurden.

Dieselben Tiere, welche als Blutspender in der voraufgehenden Versuchsreihe gedient hatten, wurden benutzt, um bei ihnen die Schilddrüse zu entfernen. Die vollständige Entfernung der Schilddrüse mit sorgfältiger Erhaltung der beiden äußeren Nebenschilddrüsen geschah in der im Berner physiologischen Institut üblichen Weise. Von diesen schilddrüsenlosen Tieren wurde in der früher beschriebenen Weise Blut entnommen und das hiervon erhaltene Serum den beiden früher benutzten Ratten intraperitoneal injiziert. Bei jedem Tiere habe ich je drei Versuche angestellt. Das Ergebnis dieser Versuche bestand darin, daß wiederum infolge der Injektion eine kleine Erhöhung der Durchschnittswerte des respiratorischen Umsatzes eintrat. Auch hier war die Erhöhung der Kohlensäurebildung etwas größer als diejenige des Sauerstoffverbrauchs. Verglichen mit den Werten, die bei Injektionen von Serum normaler Kaninchen erhalten wurden, sind die Werte nach Injektion von Serum schilddrüsenloser Tiere etwas kleiner. Die

erhaltenen Resultate enthalten keinen Fingerzeig dafür, daß im Serum schilddrüsenloser Tiere ein Stoff kreise, welcher als Gift angesehen werden könnte. Jedenfalls kann es sich um kein Gift handeln, welches in genügender Menge in 1 bzw. 2 ccm Serum vorhanden wäre, um eine Wirkung auf den so äußerst empfindlichen respiratorischen Stoffwechsel der Ratten auszuüben. Will man sich noch vorsichtiger ausdrücken, so kann man sagen, daß kein Stoff vorhanden ist, der eine größere Wirkung auszuüben vermöge als die ohnehin schon geringe von artfremdem Serum, wenn es intraperitoneal bei der Ratte injiziert wird (Tabelle V und VI).

Hierauf ging ich dazu über, bei Kaninchen sämtliche Glandulae parathyreoideae, somit auch die Schilddrüsen zu exstirpieren. Bei der Operation, die in Morphiumnarkose stattfand, wurde so verfahren, daß zuerst die beiden äußeren Glandulae parathyreoideae exstirpiert wurden, sodann die ganze Gegend der Karotis von der Schilddrüse bis zur Thoraxapertur auf etwaige akzessorische Glandulae parathyreoideae abgesucht wurde. Schließlich wurde die gesamte Schilddrüse restlos entfernt. Von den vier auf diese Weise operierten Kaninchen traten bei zwei Tieren die für Kaninchen typische Form der Tetanie auf; starker Speichelfluß, Dyspnoe, fliegende Atmung und leichte tetaniforme Krämpfe. In diesen Krampfanfällen wurde Blut aus dem Ohre entnommen, um nachher den beiden Ratten intraperitoneal injiziert zu werden. Außerdem wurde bei diesen Tieren vor Eintritt der Tetanie Blut entnommen. Das dritte Tier starb, offenbar infolge der Exstirpation, nach wenigen Tagen Beobachtung, ohne daß es zur ausgesprochenen Tetanieerscheinung gekommen wäre. Das vierte Tier zeigte innerhalb der Beobachtungszeit keine besonderen Symptome (s. Tabellen VII und VIII).

Das Ergebnis der Versuche, in welchen den Ratten Blut intraperitoneal injiziert wurde, welches auf der Höhe der parathyreopriven Tetanie entnommen worden war, war ein ziemlich ausgesprochenes. Es trat in allen Fällen eine merkliche Senkung des Mittelwertes der Kohlensäureausscheidung und des Sauerstoffverbrauchs ein, wie aus den Tabellen IX bis XII und den Kurvendarstellungen ersichtlich ist. Bedenkt man, daß sowohl die Injektion von normalem Serum wie auch die Injektion von Serum schilddrüsenloser Tiere eine Steigerung des Grundumsatzes, wenn auch nicht von sehr erheblichem Umfange, herbeiführt, so bedeutet die Senkung des Grundumsatzes nach Injektion von parathyreoprivem Serum um so mehr, denn dieses Serum muß einen Stoff enthalten haben, der so stark wirkt, daß er die antigene Steigerung des Grundumsatzes von artfremdem Serum überwindet und dazu noch den Grundumsatz herabsetzt. Aus diesen Versuchen kann daher der Schluß gezogen werden, daß sich mit Hilfe der Methode

der Prüfung des respiratorischen Umsatzes von Kaninchen in so geringen Mengen wie 1 ccm Serum die Änderungen des Blutes infolge der vollständigen Entfernung der Nebenschilddrüsen, insofern sie zur Tetanie führt, nachweisen läßt. Es wird von Interesse sein, in kommenden Versuchen zu ermitteln, ob die hier aufgedeckten Stoffwechselwirkungen einem Guanidinderivat oder einem anderen Stoffwechselprodukt zuzuschreiben seien.

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse der vorstehenden Arbeit die folgenden:

1. Kaninchenserum, intraperitoneal bei Ratten injiziert in Mengen von 1 bis 2 ccm, erhöht in geringem Umfange den respiratorischen Grundumsatz.

2. Serum von Kaninchen, denen die Schilddrüsen vollständig entfernt worden waren, wirkt in gleicher, wenn auch etwas geringerer Weise.

Dieses Versuchsergebnis spricht nicht dafür, daß im Blute schilddrüsenloser Kaninchen ein durch die Schilddrüsen zu speicherndes Gift kreise.

3. Serum, welches auf der Höhe von parathyreopriven Tetanieanfällen Kaninchen entnommen wurde, bewirkt eine merkliche Senkung des respiratorischen Grundumsatzes der Ratten. Diese Methode deckt demnach das Kreisen eines different wirkenden Körpers im Blute parathyreopriver Tiere auf.

Normaler Grundumsatz.

Tabelle I. Schwanzgezeichnete Ratte.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
20. X.	4	0,76	2,52	2,42	0,756	240,33	2,621	2,517	23—22	ruhig
24. X.	4	1,03	2,40	2,34	0,747	224,09	2,710	2,610	22—20	
26. X.	4	0,73	2,43	2,40	0,735	214,88	2,827	2,792	21—21	
28. X.	4	1,20	2,20	2,13	0,753	208,37	2,639	2,555	21—21	
2. XI.	4	1,57	2,02	2,01	0,730	189,88	2,659	2,646	22—21	
4. XI.	4	1,24	2,05	2,02	0,737	187,56	2,732	2,692	21—20	
					Mittelwert:	210,85	2,698	2,635	21,25	

Tabelle II. Links gezeichnete Ratte.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
21. X.	$3^1/_2$	0,66	2,15	2,06	0,758	271,95	2,258	2,162	22—22	ruhig
24. X.	$3^1/_2$	0,74	2,12	2,01	0,766	264,79	2,286	2,168	24—22	
27. X.	$3^1/_2$	0,97	2,10	2,06	0,740	250,64	2,893	2,348	21—21	
28. X.	$3^1/_2$	0,66	2,19	2,16	0,736	246,69	2,536	2,501	21—21	
2. XI.	4	1,21	2,23	2,16	0,756	232,97	2,393	2,296	21—22	
					Mittelwert:	253,40	2,373	2,295	21,7	

Tabelle III.

Nicht gezeichnete Ratte.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
23. X.	4	0,95	2,67	2,61	0,743	247,85	2,748	2,686	23—22	ruhig
25. X.	4	0,88	2,45	2,38	0,747	230,23	2,660	2,584	23—22	
27. X.	4	0,59	2,41	2,37	0,679	232,18	2,594	2,552	21—24	
1. XI.	4	1,46	2,54	2,39	0,772	224,10	2,833	2,666	21—22	
3. XI.	6	1,46	2,31	2,81	0,855	220,62	2,500	2,122	21—22	
					Mittelwert:	230,99	2,667	2,522	22,1	

Tabelle IV.

Mittelwerte von Tabellen I bis III (normaler Grundumsatz).

Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
210,85	2,698	2,635	21,25	Schwanzgezeichnete Ratte
253,40	2,373	2,295	21,7	Links gezeichnete Ratte
230,99	2,667	2,522	22,1	Nicht gezeichnete Ratte
		Mittelwert:		
231,74	2,579	2,484	21,6	

Einfluß der parenteralen Injektion von Serum des normalen Kaninchens.

Tabelle V.

Schwanzgezeichnete Ratte.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
					1 ccm Serum. Ruhe.					
8. XI.	3½	1,27	1,93	1,60	0,876	192,98	2,707	2,368	22—22	
9. XI.	4	1,43	2,44	2,07	0,856	196,43	3,105	2,634	21—21	am 2. Tage
11. XI.	3	0,99	1,86	1,73	0,781	196,68	3,118	2,932	21—20	am 4. Tage
14. XI.	5	1,39	2,76	2,60	0,771	197,06	2,796	2,632	22—18	am 7. Tage
					1 ccm Serum. Ruhe.					
15. XI.	6	2,17	3,18	2,90	0,796	193,82	2,733	2,493	22—21	
16. XI.	4½	2,22	2,77	2,15	0,936	203,42	3,026	2,348	24—20	am 2. Tage
18. XI.	4	0,76	2,15	2,13	0,733	189,43	2,837	2,811	21—19	am 4. Tage
20. XI.	3½	1,07	1,87	1,30	1,044	200,57	2,649	1,836	20—20	am 6. Tage
					2 ccm Serum. Unruhig.					
21. XI.	3	1,03	1,86	1,71	0,790	197,50	3,139	2,886	21—20	
23. XI.	4	0,80	2,61	1,92	0,987	213,93	3,050	2,243	22—21	am 3. Tage
24. XI.	4	1,08	2,33	2,15	0,787	202,44	2,877	2,655	21—22	am 4. Tage
25. XI.	3	0,63	1,72	1,67	0,748	196,95	2,911	2,825	20—19	am 5. Tage
					Mittelwert:	199,266	2,912	2,555	20,8	

Tabelle VI. Links gezeichnete Ratte.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
1 ccm Serum. Ruhe.										
10. XI.	3	1,14	1,87	1,72	0,789	226,95	2,736	2,526	22—24	
11. XI.	4	1,18	2,38	2,36	0,732	223,70	2,670	2,637	23—19	am 2. Tage
13. XI.	4	0,72	1,91	1,80	0,770	224,26	2,838	2,675	20—21	am 4. Tage
14. XI.	$3^1/_2$	1,16	1,93	1,81	0,774	220,79	2,497	2,342	22—19	am 5. Tage
1 ccm Serum. Ruhe.										
16. XI.	$3^1/_2$	1,33	2,25	1,91	0,855	226,12	2,842	2,413	23—22	
17. XI.	6	1,87	3,35	3,18	0,765	221,40	2,521	2,393	23—20	am 2. Tage
20. XI.	4	0,94	2,29	2,03	0,819	229,15	2,494	2,214	21—23	am 5. Tage
2 ccm Serum. Unruhig.										
21. XI.	4	1,32	2,50	2,22	0,818	223,75	2,793	2,480	21—20	
22. XI.	$3^1/_2$	0,82	2,12	2,04	0,754	220,00	2,753	2,649	22—21	am 2. Tage
23. XI.	3	0,63	1,61	1,46	0,801	223,87	2,397	2,173	22—22	am 3. Tage
24. XI.	3	0,86	1,71	1,57	0,791	223,94	2,545	2,336	23—22	am 4. Tage
					Mittelwert:	223,993	2,644	2,439	21,6	

Operation vom 28. November 1922.

Seruminjektion von schilddrüsenlosen Kaninchen.

Tabelle VII.

Schwanzgezeichnete Ratte. Mittelwerte im Normalzustand: 2,698, 2,635.

1 ccm Serum am 2. Tage nach der Operation.									
29. XI.	3	0,87	1,42	1,44	0,716	185,84	2,551	2,582	22—20
30. XI.	$4^1/_2$	1,30	2,27	2,17	0,759	187,90	2,684	2,566	21—20
1 ccm Serum am 2. Tage nach der Operation.									
1. XII.	4	0,63	2,43	2,14	0,824	220,34	3,032	2,670	21—20
4. XII.	3	0,76	1,72	1,52	0,822	203,46	2,817	2,490	21—20
1 ccm Serum am 6. Tage nach der Operation.									
5. XII.	3	0,51	1,54	1,24	0,902	179,64	2,857	2,300	21—21
8. XII.	4	1,15	1,98	1,83	0,832	196,05	2,524	2,330	21—22
8. XII.	3	1,40	1,60	1,54	0,754	182,97	2,914	2,805	22—22
					Mittelwert:	193,74	2,769	2,535	21

Tabelle VIII.

Links gezeichnete Ratte. Mittelwerte im Normalzustand: 2,373, 2,295.

1 ccm Serum am 1. Tage nach der Operation.									
30. XI.	3	0,71	1,74	1,67	0,756	213,63	2,714	2,605	22—21
1. XII.	3	0,82	1,85	1,62	0,829	222,65	2,769	2,425	23—22
1 ccm Serum am 2. Tage nach der Operation.									
2. XII.	$4^1/_2$	1,51	2,88	2,59	0,807	221,49	2,891	2,598	20—19
4. XII.	4	0,83	2,28	2,16	0,766	219,47	2,597	2,460	21—22
1 ccm Serum am 6. Tage nach der Operation.									
6. XII.	3	0,54	1,50	1,36	0,801	206,70	2,418	2,193	22—22
7. XII.	5	1,40	2,39	2,32	0,798	210,35	2,272	2,205	22—22
8. XII.	4	1,88	1,96	1,82	0,782	210,49	2,325	2,161	21—22
					Mittelwert:	214,96	2,569	2,378	21,5

Operation vom 8. Dezember 1922.

Serum von Kaninchen im Tetanieanfall entnommen.

Tabelle IX.

Schwanzgezeichnete Ratte. Mittelwerte im Normalzustand: 2,698, 2,635.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
				1 ccm Serum nach 6 Stunden.						
9. XII.	$3^1/_2$	0,95	1,79	1,59	0,794	187,85	2,726	2,422	21—22	
				1 ccm Serum vor Tetanie.						
11. XII.	$3^3/_4$	0,80	1,57	1,41	0,808	160,26	2,612	2,346	21—22	
12. XII.	$3^1/_2$	0,65	1,38	1,18	0,849	167,00	2,360	2,018	21—21	
13. XII.	3	0,62	1,31	1,15	0,659	177,34	2,462	2,161	21—22	
14. XII.	$4^1/_2$	2,15	2,12	1,86	0,836	184,27	2,556	2,218	21—22	
15. XII.	5,5	1,79	2,39	2,13	0,889	177,59	2,446	2,180	21—22	
					Mittelwert:	173,29	1,487	2,184	21,5	

Tabelle X.

Links gezeichnete Ratte. Mittelwerte im Normalzustand: 2,733, 2,295.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
				1 ccm Serum nach 6 Stunden.						
9. XII.	3	0,77	1,83	1,57	0,846	216,72	2,814	2,414	21—21	
				1 ccm Serum vor Tetanie.						
10. XII.	5	0,63	2,55	2,33	0,795	208,25	2,448	2,237	20—20	
11. XII.	3	1,17	1,35	1,27	0,772	209,58	2,147	2,019	22—22	
12. XII.	$5^3/_4$	2,36	2,79	2,63	0,770	225,35	2,153	2,021	21—21	
13. XII.	$3^1/_2$	1,10	1,82	1,69	0,782	231,47	2,246	2,086	22—23	
14. XII.	3	0,91	1,31	1,07	0,889	209,15	2,087	1,705	22—21	
16. XII.	4	1,11	1,72	1,64	0,761	203,56	2,112	2,014	21—22	
					Mittelwert:	214,56	2,198	2,013	21—22	

Operation vom 22. Dezember 1922.

Serum von Kaninchen im Tetanieanfall entnommen.

Tabelle XI.

Schwanzgezeichnete Ratte. Mittelwerte im Normalzustand: 2,698, 2,635.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
				1 ccm Serum vor Tetanie.						
23. XI.	3	0,74	1,55	1,33	0,846	210,35	2,456	2,107	21—22	
24. XII.	3	0,86	1,46	1,30	0,725	212,47	2,290	2,039	22—22	
26. XII.	3	0,71	1,48	1,36	0,790	214,42	2,300	2,114	22—21	
					Mittelwert:	212,41	2,345	2,086	21,5	

Tabelle XII.

Links gezeichnete Ratte. Mittelwerte im Normalzustand: 2,373, 2,295.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
				1 ccm Serum vor Tetanie.						
23. XII.	3	0,81	1,35	1,22	0,803	203,37	2,213	2,015	21—22	
24. XII.	3	0,89	1,30	1,22	0,774	205,79	2,108	1,983	22—21	
26. XII.	3	0,70	1,36	1,30	0,759	208,13	2,178	2,082	21—20	
					Mittelwert:	205,76	2,166	2,033	21	

Kontrollversuch.

Seruminjektion von normalen Kaninchen.

Tabelle XIII. Schwanzgezeichnete Ratte.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
					1 ccm Serum.					
20. XII.	$5^1/_4$	1,29	2,61	2,33	0,813	200,81	2,475	2,210	22—23	
21. XII.	4	1,09	2,28	1,87	0,887	219,73	2,594	2,127	21—23	
22. XII.	$4^3/_4$	2,47	2,67	2,29	0,846	215,07	2,613	2,241	22—21	
					Mittelwert:	211,87	2,560	2,192	22	

Tabelle XIV. Links gezeichnete Ratte.

Datum 1922	Dauer des Versuchs	H_2O	CO_2	O_2	Respirationsquotient	Gewicht der Ratte	CO_2 pro kg und Stunde	O_2 pro kg und Stunde	Temperatur im Kasten	Bemerkungen
					1 ccm Serum.					
20. XII.	3	0,88	1,52	1,44	0,766	206,93	2,448	2,319	21—21	
21. XII.	3	0,75	1,54	1,39	0,804	206,81	2,482	2,240	21—21	
22. XII.	3	0,70	1,42	1,31	0,787	204,53	2,314	2,134	22—23	
					Mittelwert:	206,09	3,414	2,227	21,5	

Bemerkungen zu den Abb. 1 bis 8.

-o-o-o-o- bedeutet den Mittelwert des Grundumsatzes von CO_2

×-×-× bedeutet den Mittelwert des Grundumsatzes von O_2

——— bedeutet den Mittelwert der Kohlensäurebildung pro kg Körpergewicht und Stunde

- - - - - - bedeutet den Mittelwert des Sauerstoffverbrauchs pro kg Körpergewicht und Stunde

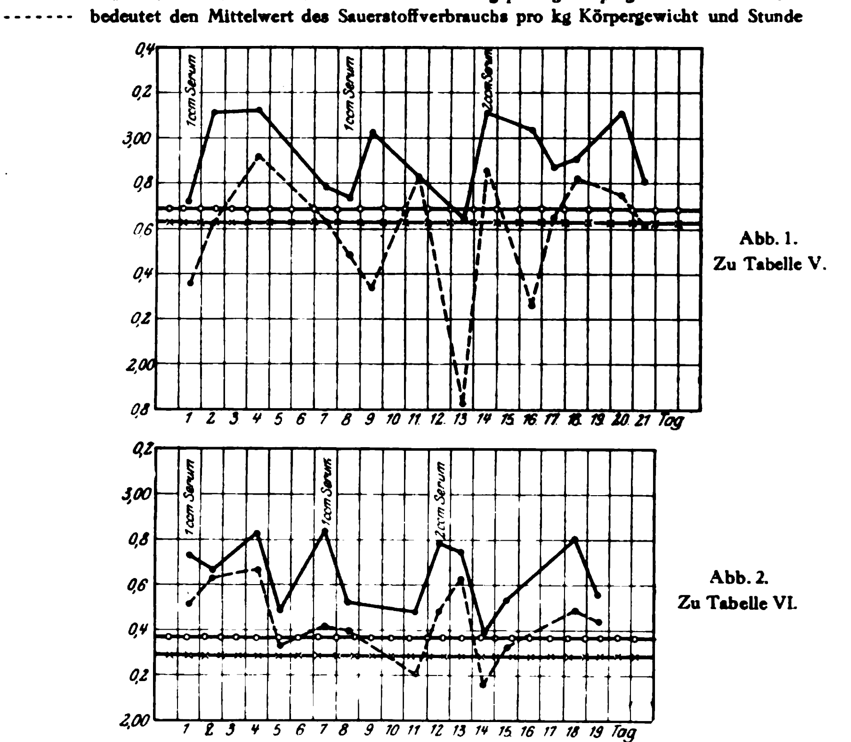


Abb. 1. Zu Tabelle V.

Abb. 2. Zu Tabelle VI.

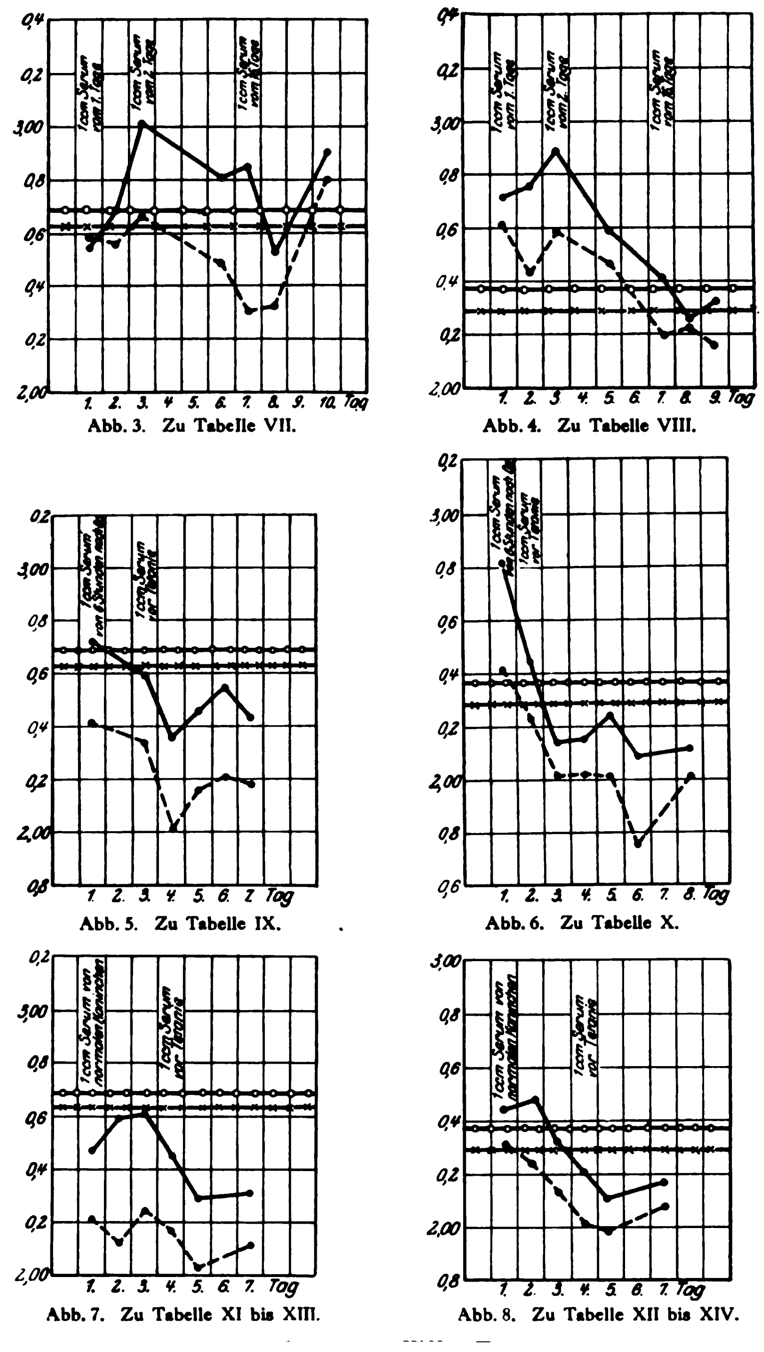


Abb. 3. Zu Tabelle VII.

Abb. 4. Zu Tabelle VIII.

Abb. 5. Zu Tabelle IX.

Abb. 6. Zu Tabelle X.

Abb. 7. Zu Tabelle XI bis XIII.

Abb. 8. Zu Tabelle XII bis XIV.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 59.

Über den Einfluß der Umstimmung auf die glykosurische Wirkung subkutaner Adrenalininjektion.

Von

Ryotaro Tsukamoto.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

In verschiedenen vorausgegangenen Arbeiten aus dem Berner physiologischen Institut über die Wirkung innerer Sekrete ist der Auffassung Rechnung getragen worden, daß ein Faktor, von dem die Wirkung innerer Sekrete abhängt, dasjenige ist, was *Asher* mit Übertragung eines *Hering*schen Begriffs auf dieses Gebiet die Stimmung der Wirkungsorte nennt. Die nachfolgende Arbeit beschäftigt sich im weiteren Verfolg dieses Gedankenganges mit der Frage, wie sich die glykosurische Wirkung des Adrenalins gestaltet, wenn das Versuchstier verschiedenen Bedingungen unterworfen wird, von denen man annehmen kann, daß sie eine Umstimmung im Organismus herbeiführen.

Die Frage der glykosurischen Wirkung des Adrenalins und ihrer Beziehung zur hyperglykämischen Wirkung des Adrenalins ist schon vielfach bearbeitet worden. Eine sehr gute Zusammenstellung der wichtigsten hierbei in Betracht kommenden Verhältnisse findet sich in einer neueren Arbeit von *Fritz Hildebrandt*[1]) aus dem Heidelberger pharmakologischen Institut. Auf diese Arbeit verweise ich auch wegen der wichtigsten einschlägigen Literatur. Um die zuckertreibende Wirkung des Adrenalins zu untersuchen, hat man neuerdings meist die Änderung des Blutzuckergehaltes zugrunde gelegt. Seitdem man die ausgezeichnete *Bang*sche Mikroanalyse des Zuckers im Blute besitzt, ist dies zweifelsohne in sehr vielen Fällen der richtige Weg, um so mehr, als die Änderungen im Blutzuckergehalt das Primäre sind, während die Zuckerausscheidung durch die Niere etwas Sekundäres ist, was nicht notwendigerweise mit der Änderung des Blutzuckergehaltes parallel zu gehen braucht. Es waren bestimmte Gründe, welche mich

---

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 88, 80, 1920.

veranlaßt haben, die Menge des im Harn ausgeschiedenen Zuckers als Kriterium für die Wirkung des Adrenalins zu wählen. Der eine Grund war der, daß, nicht zum wenigsten durch die oben genannte *Hildebrandt*sche Arbeit, der Nachweis geliefert worden ist, daß, wenn man für genügenden Zuckerbestand im Organismus sorgt, die glykosurische Wirkung des Adrenalins ebenso sicher ist wie diejenige der hyperglykämischen. Voraussetzung ist dabei natürlich, daß die Versuchsbedingungen so sind, daß die Niere nicht geschädigt wird. Ein weiterer Grund lag darin, daß ich zahlreiche Versuche über längere Versuchsperioden an dem gleichen Tiere anstellen wollte. Selbst bei der Mikroanalyse ist die häufige Blutentnahme kein ganz fehlerfreier Eingriff, vornehmlich deshalb, weil schließlich an dem hauptsächlichst der Blutentnahme zugänglichen Orte, falls man Kaninchen nimmt, die Verhältnisse sich so ändern, daß Schwierigkeiten bei der Blutentnahme entstehen. Sodann aber lag mir gerade daran, auch das Funktionieren der Niere mit zu untersuchen, weil für die Beurteilung der Reaktionsweise des Gesamtorganismus das Verhalten der Niere eben nicht gleichgültig ist.

Der mir von Prof. *Asher* vorgeschlagene Versuchsplan bestand darin, daß ich zuerst die Adrenalinglykosurie am normalen Kaninchen ermittelte. Nach Feststellung hiervon ging ich dazu über, die Kaninchen mit Schilddrüsenpräparaten zu behandeln, um sie dem bekannten stoffwechselverändernden Einfluß dieses Stoffes zu unterziehen. Unter genau gleichen Bedingungen wurde wiederum die Adrenalinglykosurie untersucht. Als Gegenstück hierzu stand das dritte Verfahren in der Untersuchung der Adrenalinglykosurie am Kaninchen nach totaler Schilddrüsenexstirpation. Als letztes Verfahren, um eine Umstimmung im Gesamtorganismus herbeizuführen, wurde ein starker Blutentzug vorgenommen. Um die mehr mechanischen Kreislaufstörungen mit ihren Folgen auszuschalten, wurde sofort nach dem Blutentzug eine Transfusion mit gelatinehaltiger Ringerlösung ausgeführt.

Was die Methode anbelangt, so habe ich die Zuckeranalyse im Harn nach der *Bertrand*schen Methode bestimmt, die in verschiedenen methodischen Lehrbüchern genau beschrieben ist. Ich möchte nur erwähnen, daß ich bei Ausführung der *Bertrand*schen Methode großes Gewicht auf die Art des Kochens bei der Bestimmung gelegt habe. Ich benutzte zum Kochen eine mäßig große Gasflamme, mit welcher die in einem 250 ccm fassenden Erlenmeyerkolben sich befindende zu analysierende Flüssigkeit genau innerhalb $4^5/_6$ bis 5 Minuten so weit erwärmt ist, daß an dem Flüssigkeitsspiegel die erste Gasblase auftritt. Etwa 30 Sekunden nach dem Auftreten der ersten Gasblase gelangt die Flüssigkeit, wenn man den Kolben auf einem Drahtnetz mit Asbest, das in der Mitte gerade zur Rotglut gekommen ist, hält, zum Siedepunkt und siedet ringsherum an den Kolbenwänden. Mit dieser Art des Kochens erhält man meiner Erfahrung nach bei allen Kontrollanalysen übereinstimmende Resultate. Da der Harn nach Adrenalin-

injektion meist kleine Mengen von Eiweiß enthält, mußte ich für vollständige Beseitigung dieser kleinen Eiweißmengen sorgen. Dies geschah auf die Weise, daß ich zunächst den Harn mit Hilfe einer 2proz. Essigsäurelösung schwach sauer machte, dann filtrierte und nochmals die Reaktion prüfte, weil der zu schwach angesäuerte Harn beim Filtrieren wieder alkalisch werden kann. Den richtig sauren Harn brachte ich in ein Becherglas und kochte, bis eine gute Fällung des Eiweißes eintrat, wobei der Harn immer mäßig sauer bleiben muß. Nach dem Kochen setzte ich 1 bis 2 Tropfen 1proz. Kalilauge hinzu und kochte noch einmal. Hiernach fällt alles Eiweiß in feiner flockiger Form, die Reaktion bleibt aber sauer. Es muß natürlich hierauf genau geachtet werden, damit keine Zersetzung des Zuckers im Harn eintritt.

Für die Adrenalininjektionen benutzte ich das „Adrenalin Clin. pulv. pur.“ Hiervon habe ich 0,05 g unter Zusatz einiger Tropfen n/10 HCl in 100 ccm sterilem destillierten Wasser gelöst. Ich habe es praktisch gefunden, die in Dunkelflaschen gehaltene Adrenalinlösung erst nach 5 Tagen zu benutzen, weil ich beobachtete, daß in den ersten 5 Tagen die Lösung inkonstante Resultate geben konnte.

Das von mir benutzte Versuchstier war das Kaninchen. Die Kaninchen wurden möglichst schonend auf einem Kaninchenbrett gefesselt. Um die Körpertemperatur konstant zu erhalten, wurde, wenn das nötig war, das Tier durch regulierte Glühlampen erwärmt. Ich betrachte die genaue Regelung der Körpertemperatur des aufgebundenen Tieres bei Untersuchungen, die den Kohlenstoffhydratwechsel und die Diurese betreffen, für eine unerläßliche Maßnahme. Den Harn entnahm ich mit Hilfe von sterilen Kathetern. Ich benutzte stets männliche Kaninchen, bei denen sich ein dünner elastischer Katheter leicht einführen läßt, und das mehrstündige Liegen dieses Katheters wird ohne jede Beschwerde für das Tier ertragen. Der Harn wurde in vorgelegten Maßzylindern aufgefangen.

Die Körpertemperatur des Kaninchens ist gewöhnlich 38,3 bis 38,6° C. Nach der Injektion von 0,5 mg Adrenalin pro Kilogramm Körpergewicht ändert sich die Temperatur in der nachfolgenden Weise. ½ Stunde nach der Injektion sinkt sie um 0,3 bis 0,5° C und bleibt ½ bis 1 Stunde auf diesem niedrigeren Stande. Dann erhöht sie sich wieder auf 38,8 bisweilen auf 39° C und bleibt 4 bis 5 Stunden in dieser Höhe, trotzdem das Tier ruhig auf dem Kaninchenbrett gefesselt liegt. Abweichungen von diesem Temperaturverlauf entweder in dem Sinne, daß sie sehr tief sinkt oder ungewöhnlich steigt, deutet auf kranke Tiere. Alle solche habe ich von meinem Versuche ausgeschlossen. Während der ganzen Versuchsdauer blieb ein Thermometer im Rektum, um die Temperatur zu kontrollieren.

Die zu den Versuchen benutzten Tiere durften nicht zu jung sein, weil zu jugendliche Tiere mehrfache Adrenalininjektionen nicht gut vertragen. Alle meine Tiere wurden, um einen guten Kohlehydratbestand zu sichern, reichlich mit Rüben ernährt. Außerdem gab ich vor jedem Versuch 100 ccm Milch. Dies tat ich vor allem deshalb, weil durch diesen Versuchseingriff auf milde Weise für eine gute Diurese gesorgt war. 15 Minuten später injizierte ich an der Innenseite des Oberschenkels subkutan die Adrenalinlösung.

In den nachfolgenden Tabellen I bis VII gebe ich eine Übersicht in Protokollen und Kurven über die Ergebnisse meiner *Versuche an einem normalen Kaninchen.*

Tabelle I.

Kaninchen 1, ♀, normal.

16. März. Körpergewicht 2390 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,18 mg. Körpertemperatur 38,0° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5., 6., 7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge .	50,5	30,4	21,6	17,0	15,1	3,2	2,2	etwa 4,0	107,4
Aussehen d. Harns	leicht getrübt	klar	klar	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	
Reaktion . .	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	schwach alkal.	schwach alkal.	schwach alkal.	stark alkal.	
Eiweiß . . .	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(—)	
Zucker i. Proz.	0,4	3,7	4,4	3,6	1,8	0,8	(—)	(—)	
Zuckergew. .	202,0	1124,8	950,4	622,0	271,8	25,6	(—)		3171,0

Tabelle II.

Kaninchen 1, ♀, normal.

30. April. Körpergewicht 2556 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,27 mg. Körpertemperatur 38,0° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge .	54,0	38,8	31,0	13,8	15,3	10,5	3,4	3,0	2,5	5,0	108,6
Aussehen d. Harns	fast klar	klar	klar	schw. getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	stark getrübt	
Reaktion . .	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	fast neutr.	sauer	stark sauer	stark sauer	alkal.	
Eiweiß . . .	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(—)	
Zucker i. Proz.	0,84	1,366	3,9	4,3	1,3	1,0	0,6	0,3	(—)	(—)	
Zuckergew. .	452,6	530,0	1209,0	593,4	195,0	105,0	10,4	9,0	(—)		3557,4

Tabelle III.

Kaninchen 3, ♂, normal.

5. Mai. Körpergewicht 2070 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,035 mg. Körpertemperatur 38,0° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Sdt.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge	Nächsten Morgen
Harnmenge .	17,4	13,4	12,5	10,8	11,0	6,8	6,4	4,2	3,4	5,0	82,5	7,5
Aussehen des Harns . . .	stark getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt		klar
Reaktion . .	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	sehr schw. alkal.	sehr schw. alkal.	stark alkal.		sauer
Eiweiß . . .	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+)	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(—)		(—) Spur
Zucker i. Proz.	1,0	3,8	5,7	6,3	4,8	2,8	1,2	0,6	(—)	(—)		(—)
Zuckergewicht	174,0	509,2	712,5	680,4	528,0	208,4	76,8	25,2	(—)	—	2914,5	(—)

Tabelle IV.

Kaninchen 4, ♀, normal.

6. Mai. Körpergewicht 2030 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,01 mg. Körpertemperatur 38,3° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	28,0	43,0	25,8	18,6	14,4	13,0	3,5	1,8		8,0	146,3
Aussehen d. Harns	getrübt	getrübt	fast klar	klar	klar	klar	leicht getrübt	getrübt		getrübt	
Reaktion	alkal.	alkal.	sehr schw. sauer	schw. sauer	fast neutr.	neutr.	schw. sauer	sauer		alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(—)	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur		(—)	
Zucker i. Proz.	1,0	1,5	3,95	5,0	3,45	1,7	0,8	(—)		(—)	
Zuckergew.	280,0	645,0	1019,0	930,0	496,8	221,0	28,0	(—)			3619,9

Tabelle V.

Kaninchen 5, ♂, normal.

17. Mai. Körpergewicht 2510 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,25 mg. Körpertemperatur 38,5° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	38,5	30,1	16,5	11,8	9,4	6,0	5,2	4,2	4,4	7,2	117,5
Aussehen d. Harns	leicht getrübt	leicht getrübt	fast klar	fast klar	klar	klar	fast klar	klar	klar	getrübt	
Reaktion	alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. sauer	schw. sauer	schw. sauer	schw. sauer	alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(—)	
Zucker i. Proz.	0,6	2,5	5,2	6,8	5,25	1,15	0,4	(—)	(—)	(—)	
Zuckergew.	231,0	752,5	858,0	802,4	4093,5	69,0	28,8	(—)	(—)		3227,0

Tabelle VI.

Kaninchen 7, ♂, normal.

25. Mai. Körpergewicht 2050 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,02 mg. Körpertemperatur 38,3° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	21,3	40,8	32,0	22,2	15,5	8,2	4,0	3,2	2,0	7,0	147,2
Aussehen d. Harns	leicht getrübt	klar	klar	getrübt	getrübt	stark getrübt	stark getrübt	stark getrübt	stark getrübt	stark getrübt	
Reaktion	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	sauer	alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(—)	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) mäßig	(—)	
Zucker i. Proz.	0,25	1,1	2,8	4,3	5,0	3,0	1,2	0,4	(—)	(—)	
Zuckergew.	53,25	448,8	796,0	954,6	775,0	246,0	48,0	12,8	(—)	(—)	3354,45

Tabelle VII.

Kaninchen 7, ♂, normal.

31. Mai. Körpergewicht 2080 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,04 mg. Körpertemperatur 38,4° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge . .	24,4	18,3	21,8	15,6	8,4	4,8	4,0	2,8	2,3	4,0	1040
Aussehen des Harns . . .	leicht getrübt	klar	klar	klar	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	
Reaktion . . .	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. sauer	schw. sauer	alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(±)	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	( ) gering	(+) gering	(+) gering	(—)	
Zucker in Proz.	0,75	3,25	4,25	5,5	6,55	5,2	3,2	0,8	(—)		
Zuckergewicht .	183,0	594,75	926,5	866,0	550,2	249,6	128,0	22,4	(—)	(—)	3490,45

Es ergibt sich aus den vorstehenden Tabellen, daß die Harnmenge gewöhnlich in der ersten Stunde, zuweilen aber in der zweiten Stunde ihren maximalen Wert erreicht und dann allmählich sich vermindert. Nach der siebenten oder achten Stunde scheidet das Tier nur noch 2 bis 3 ccm konzentrierten Harns aus. Die Kurve, welche die in jeder Stunde ausgeschiedene Zuckermenge wiedergibt, hat eine charakteristische Gestalt, trotzdem die Höhe des Maximalwertes nicht immer die gleiche ist. Die Kurve erreicht ihr Maximum erst in der dritten Stunde, dann fällt sie steil ab, um nach der siebenten oder achten Stunde dem Nullwerte sich zu nähern. Die Kurve, welche die Prozentmenge an Zucker im Harn darstellt, verläuft im allgemeinen parallel mit der der Gesamtmenge, ist aber zeitlich um eine ganze Stunde verschoben. Die Gesamtmenge ausgeschiedenen Zuckers beträgt gewöhnlich zwischen 3000 bis 3600 mg, unabhängig davon, ob die gesamte Harnmenge und der Prozentgehalt des Zuckers ein größerer oder ein kleinerer ist. Der Prozentgehalt an Zucker erhöht sich, wenn die Harnmenge klein ist, vermindert sich jedoch bei Ausscheidung von größeren Harnmengen, eine Erscheinung, deren Ursachen selbstverständlich sind. Ich habe bei gesunden und richtig gefütterten Tieren selbst bei fortgesetzten Adrenalininjektionen stets genau, wie es *Hildebrandt* angibt, gute glykosurische Wirkungen erhalten.

Meine *nächste Versuchsreihe* beschäftigt sich mit den Folgen der subkutanen Adrenalininjektionen bei Tieren, die mit Schilddrüsenpräparaten gefüttert waren. Die Folgen der Schilddrüsenfütterung am Kaninchen sind im Berner physiologischen Institut häufig untersucht worden. Der Stoffwechsel wird gesteigert, was am schlagendsten aus dem erhöhten Sauerstoffbedürfnis solcher Tiere hervorgeht. An Ratten wie an Kaninchen zeigten die Arbeiten von *Abelin* und *Jaffe*[1]),

[1]) Diese Zeitschr. 102, 39, 1920.

daß der Glykogenbestand sehr herabgesetzt sein kann. Die Diurese wird vermehrt. Ich gebrauchte als Schilddrüsenpräparat die Tabletten von Borrough Welcome & Co., und zwar Tabletten zu 0,324 g Drüsensubstanz pro Stück. Die zerriebenen Tabletten habe ich in 100 ccm Wasser suspendiert und per Schlundsonde den Kaninchen eingegeben. Während der Schilddrüsenzufuhr habe ich von Tag zu Tag den Harn und die Temperatur untersucht. Die Temperatur aller mit Schilddrüse gefütterten Kaninchen erhöht sich etwa eine Woche nach dem Anfangen der Behandlung bis auf 39°. Die Tiere werden lebhaft, munter und reizbar, jedoch magern sie allmählich ab. Zucker habe ich niemals im Harn vor der Adrenalininjektion beobachtet, hingegen trat manchmal spurweise Eiweiß auf.

Die Resultate meiner Versuche gebe ich in den Tabellen VIII, IX und X.

Tabelle VIII. Kaninchen 2, ♂.

Schilddrüsenextraktinjektion.

Adrenalinversuch. Körpergewicht 1850 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 0,925 mg. Körpertemperatur 38,0° C.

Datum:	1.V.	2.V.	3.V.	4.V.	5.V.	6.V.	7.V.	8.V.	9.V.	10. V.	11. V.	12. V.	13. V.	14. V.	15. V.	
K.-G. .	1920	1930	1930	1920	1930	1920	1900	1900	1900	1840	1860	1900	1900	1870	1850	70 abgemagert
Dosis .	2,88	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,85	4,75	4,6	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	59,58 ganze Menge

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor d. Injektion	Ganze Menge	Nächst. Morgen
Harnmenge	3,8	9,0	10,6	7,5	6,0	5,5	4,6	2,0	2,0	etwa 1,0 ccm	51,0	7,0
Aussehen des Harns	getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	stark getrübt		
Reaktion .	sauer	stark sauer	stark sauer	sauer	sauer	sauer	sauer	sauer	sauer	sauer		sauer
Eiweiß . .	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur		(+) Spur
Zucker in Proz. .	2,4	7,1	9,3	13,0	11,5	5,8	3,65	1,25	0,1	(—)		(—)
Zuckergew.	91,2	639,0	985,8	975,0	690,0	175,45	167,9	25,0	8,0	(—)	3757,35	(—)

Tabelle IX. Kaninchen 1, ♀.

Schilddrüsenpräparat injiziert und gefüttert.

19. Mai. Adrenalinversuch. Körpergewicht 2400 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,2 mg. Körpertemperatur 38,0° C.

Datum:	5.V.	6.V.	7.V.	8.V.	9.V.	10. V.	11. V.	12. V.	13. V.	14. V.	15. V.	16. V.	17. V.	18. V.	
K.-G. .	2550	2540	2500	2560	2560	2560	2600	2600	2580	2560	2540	2500	2450	2400	150 abgemagert
Dosis .	3,87	3,81	3,87	6,51	6,4	6,4	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	1 Tab.	1 Tab.	1 Tab.	65,86 ccm 3 Tab. ganze Menge

Tabelle IX. (Fortsetzung.)

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6., 7., 8. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge . .	18,2	13,2	9,4	8,4	8,2	19,5	15,0	57,4
Aussehen des Harns . . .	getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	stark getrübt	
Reaktion . . .	schwach alkal.	sehr schwach sauer	sauer	sauer	sauer	sauer	stark alkalisch	
Eiweiß	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) gering	
Zucker i. Proz.	0,45	0,75	1,15	0,85	0,5	(—)	(—)	
Zuckergewicht .	81,0	99,0	108,1	71,4	41,0	(—)	(—)	401,4

Tabelle X.

Kaninchen 5, ♂.

Schilddrüsenpräparat gefüttert.

9. Juni. Adrenalinversuch. Körpergewicht 1890 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 0,945 mg. Körpertemperatur 38,5° C.

Datum:	25. V.	26. V.	27. V.	28. V.	29. V.	30. V.	31. V.	1. VI.	2. VI.	3. VI.	4. VI.	5. VI.	6. VI.	7. VI.	8. VI.	
K.-G. . .	2450	2460	2450	2430	2400	2290	2270	2220	1970	1970	1860	1850	1860	1880	1870	580 abgemagert
Tablette	1	1	1	1	1	1	1	nicht gefüttert	1	nicht gefüttert	nicht gefüttert	1	1	1	1	12 ganze Menge

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge .	4,0	9,6	13,5	13,2	7,0	5,0	3,0	2,6	2,3	3,5	55,3
Aussehen des Harns . .	getrübt	leicht getrübt	klar	klar	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	stark getrübt	
Reaktion . .	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	fast sauer	fast sauer	sauer	sauer	
Eiweiß . . .	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(—)	
Zucker i. Proz.	0,6	0,8	1,0	1,25	1,5	1,25	0,6	(—)	(—)	(—)	
Zuckergew. .	24,0	76,8	135,0	165,05	112,5	62,5	18,0	(—)	(—)		593,85

Es ergibt sich bei Durchsicht der Protokolle, daß die Injektion von Adrenalin bei mit Schilddrüse vorbehandelten Tieren zwei entgegengesetzte Resultate fördert. In dem einen Falle wird im Vergleich zum Normaltier sehr viel weniger Zucker ausgeschieden, in dem anderen Falle aber ausgesprochen mehr. In jedem Falle aber zeigt sich, daß zeitlich die Ausscheidung des Zuckers nach einer früheren Periode verschoben ist. Es ist nicht schwer, diese anscheinend widersprechenden Ergebnisse aus bekannten Wirkungen des Schilddrüsenhormons zu erklären. In denjenigen Fällen, wo auf Grund der Individualität des

Tieres die übermäßige Schilddrüsenzufuhr das Glykogendepot des Organismus entleert, muß natürlich die Glykosurie eine geringere sein; in denjenigen Fällen aber, wo dies nicht eintritt, kommt die von *Asher* und seinen Mitarbeitern genauer verfolgte erhöhte Empfindlichkeit auf Adrenalin zum Ausdruck. Sie kommt auch darin zum Ausdruck, daß die Zuckerausscheidung früher eintritt. Bekanntlich haben *Asher* und *Flack* in der Arbeit, wo zum erstenmal die sekretorische Innervation der Schilddrüsen gezeigt wurde und damit eine sichere Basis für eine physiologische innere Sekretion durch die Schilddrüse geschaffen worden war, sich besonders der Steigerung der Adrenalinempfindlichkeit als Kriterium für vermehrte Schilddrüsensekretzufuhr bedient. Viele Jahre später ist dann diese Reaktion von *Asher* und *Flack* als Goetschreaktion bezeichnet worden.

Meine *dritte Versuchsreihe* beschäftigt sich mit der Reaktion auf subkutane Adrenalininjektion bei solchen Tieren, bei denen ich einen Blutentzug mit nachfolgender Transfusion von Ringergelatinelösung gemacht hatte. Die von mir benutzte Transfusionslösung hatte folgende Zusammensetzung:

Chemisch reines NaCl	9,0
„ „ KCl	0,2
„ „ $CaCl_2$	0,2
„ „ $NaHCO_3$	0,1
Gelatine (auf 1 Liter destillierten Wassers) . .	30,0

Ich löste zunächst 30 g Gelatine in etwa 900 ccm destillierten kochenden Wassers auf und kühlte dann bis auf 60° ab, dann tat ich Hühnereiweiß von zwei Eiern hinein und kochte die Lösung nach kräftiger Durchmischung in einem Wasserbade. Nach Filtration der Lösung durch ein Faltenfilter tat ich die anderen Reagenzien hinzu, kochte noch einmal nach einer Prüfung der Reaktion und ergänzte die Lösung nach nochmaliger Filtration bis zu einem Liter. Ich sterilisierte schließlich in einem Autoklaven. Die Blutentnahme geschah steril aus der Carotis sinistra und die Zufuhr der Ringergelatinelösung in die Vena jugularis dextra.

Der Hämoglobingehalt des Blutes wurde von mir fortlaufend mit Hilfe des *Sahli*schen Hämoglobinometers bestimmt. Die Einzelangaben sind aus meinen nachfolgenden Protokollen ersichtlich. Es zeigt sich im Anfang der erwartete tiefe Sturz, der sich allmählich wieder in eine Rückkehr nach der Norm zu verändert. Über die Resultate meiner Versuchsreihe geben die nachfolgenden Tabellen XI bis XIX einen Überblick.

Tabelle XI.

Kaninchen 3.

Schilddrüsenexstirpation.

11. Mai. 5 Tage nach der Operation. Körpergewicht 2050 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,02 mg. Körpertemperatur 38,7° C.
2. Juni. 23 Tage nach der Operation. Körpergewicht 2020 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,01 mg. Körpertemperatur 38,3° C.

	Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor d. Injektion	Ganze Menge
5	Harnmenge	49,2	15,2	11,2	10,5	9,9	8,0	5,5	3,2	2,0	6,4	112,7
23		18,0	19,4	20,3	13,2	9,9	4,8	3,8	2,5	2,2	4,3	76,1
5	Aussehen des Harns	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	stark getrübt	
23		leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	
5	Reaktion	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	
23		alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	
5	Eiweiß	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) Spur	
23		(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) gering	(+) gering	(—)	
5	Zucker i. Proz.	0,45	3,6	5,19	6,2	5,5	3,8	1,4	0,5	(—)	(—)	
23		(—)	1,2	3,4	6,3	8,1	8,0	5,3	1,5	0,8	(—)	
5	Zuckergewicht	221,4	547,2	570,9	651,0	544,5	304,0	77,0	16,0	(—)	(—)	2932,0
23		(—)	232,8	690,2	831,6	801,9	384,0	201,4	37,5	16,0	(—)	3195,4

Tabelle XII.

Kaninchen 4, ♀.

Exstirpation.

3. Juni. 22 Tage nach der Operation. Körpergewicht 2090 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,05 mg. Körpertemperatur 38,0° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor d. Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	27,0	42,0	45,5	30,2	18,5	16,0	7,5	3,8	2,6	3,8	166,1
Aussehen des Harns	getrübt	klar	leicht getrübt	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	
Reaktion	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(—)	
Zucker i. Proz.	(—)	0,2	0,4	3,9	5,5	4,8	3,0	1,5	0,7	(—)	
Zuckergewicht	(—)	84,0	182,0	1177,8	1017,5	768,0	2250	57,0	18,2	(—)	3529,5

Tabelle XIII. Kaninchen 6, ♂. Blutentnahme.

23. Mai 4 Uhr nachmittags Operation. Blutentnahme 50,0 ccm. Ringergelatineeinfuhr 50,0 ccm. Hämoglobingehalt am 23. Mai 9 Uhr 81 ccm, am 24. Mai 9 Uhr 39 ccm. Körpergewicht am 23. Mai 2050 g, am 24. Mai 1970 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 0,98 mg. Körpertemperatur 38,0° C.

24. V. Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	28,0	26,6	17,0	8,0	5,6	3,8	1,6	2,0		12,0	92,6
Aussehen d. Harns	klar	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt		klar	
Reaktion	ganz schw. sauer	fast neutr.	alkal.	alkal.	schw. sauer	schw. sauer	sauer	sauer		schwach alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(±)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur		(—)	
Zucker i. Proz.	0,16	0,25	0,98	4,7	5,0	3,2	1,3	0,2		(—)	
Zuckergew.	44,8	66,5	166,6	376,0	280,0	121,6	20,8	4,0		(—)	1080,3

Tabelle XIV. Kaninchen 6, ♂. II. X. nach Blutentnahme.

26. Mai. Hämoglobin 42 ccm. Körpergewicht 1870 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 0,94 mg. Körpertemperatur 38,3°C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	23,6	31,4	16,9	7,0	2,5	2,4	3,2	9,9	5,0	6,0	87,0
Aussehen d. Harns	leicht getrübt	klar	leicht getrübt	getrübt	getrübt	stark getrübt	stark getrübt	leicht getrübt	getrübt	leicht getrübt	
Reaktion	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	schw. sauer	sauer	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(±)	(—)	(—)	(—)	
Zucker i. Proz.	0,2	0,25	2,2	4,9	4,4	0,75	0,4	(—)	(—)	(—)	
Zuckergew.	47,2	78,5	371,8	343,0	110,0	18,0	12,8	(—)			970,5

Tabelle XV. Kaninchen 6, ♂. III. X. nach Blutentnahme.

29. Mai. Hämoglobin 47 ccm. Körpergewicht 1810 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 0,9 mg. Körpertemperatur 38,3°C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	28,0	26,5	12,8	4,0	2,8	2,0	2,0	2,2	2,2	5,0	97,1
Aussehen d. Harns	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	
Reaktion	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	sauer	ganz schw. alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	
Eiweiß	(—)	(—)	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(—)	
Zucker i. Proz.	0,19	1,2	4,6	6,3	3,9	1,6	0,4	(—)	(—)		
Zuckergew.	53,2	318,0	590,8	252,0	109,2	32,0	8,0	(—)	(—)	(—)	1363,2

Tabelle XVI. Kaninchen 6, ♂.

20 Tage nach der Blutentnahme.

12. Juni. Hämoglobin 77 ccm. Körpergewicht 1820 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 0,91 mg. Körpertemperatur 38,4°C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	21,6	28,0	18,8	10,9	10,4	6,8	4,2	1,6		6,0	102,3
Aussehen d. Harns	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt		getrübt	
Reaktion	alkal.	alkal.	alkal	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.		alkal.	
Eiweiß	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) mäßig	(+) mäßig		(—)	
Zucker i. Proz.	0,4	1,6	4,8	7,0	5,3	2,1	0,8	0,2		(—)	
Zuckergew.	86,4	448,0	902,4	763,0	551,2	142,8	33,6	6,4		(—)	2933,8

Tabelle XVII. Kaninchen 7, ♂.

Blutentnahme.

6. Juni nachmittags 3 Uhr 40 Operation. Blutentnahme 54,0 ccm. Ringergelatineeinfuhr 60,0 ccm. Hämoglobingehalt am 6. Juni 11 Uhr 86 ccm, am 7. Juni 9 Uhr 41 ccm. Körpergewicht am 6. Juni 2090 g, am 7. Juni 2060 g. 7. Juni 9 Uhr 30 Adrenalinversuch. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,03 mg. Körpertemperatur 38,3° C.

Zeit der Harnanalyse:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	14,2	13,4	10,3	10,0	5,0	2,0	2,0	1,8	1,2	3,0	47,9
Aussehen des Harns	fast klar	fast klar	fast klar	fast klar	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	
Reaktion	schw. sauer	alkal.	alkal.	alkal.	sauer	sauer	sauer	sauer	sauer	sauer	
Eiweiß	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) gering	(+) gering	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(±)	
Zucker in Proz.	(—)	1,425	5,3	5,8	6,6	6,5	0,83	0,3	(—)		
Zuckergewicht	(—)	190,95	545,9	580,0	330,0	130,0	16,6	5,4	(—)	(—)	1798,25

Tabelle XVIII. Kaninchen 7, ♂.

II. X. nach Blutentnahme.

9. Juni. Hämoglobin 44 ccm. Körpergewicht 2000 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 1,0 mg. Körpertemperatur 38,3° C.

Versuchszeit:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor der Injektion	Ganze Menge
Harnmenge	26,2	22,0	20,1	12,8	6,0	2,8	2,4	1,5	2,0	5,6	93,8
Aussehen d. Harns	leicht getrübt	leicht getrübt	leicht getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	getrübt	
Reaktion	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	sauer	sauer	sauer	sauer	alkal.	
Eiweiß	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) gering	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(—)	
Zucker i. Proz.	0,25	0,8	2,5	4,0	4,8	4,05	1,3	0,3	(—)		
Zuckergew.	65,5	176,0	502,5	512,0	288,0	113,4	31,2	4,5	(—)	(—)	1692,1

Tabelle XIX. Kaninchen 7, ♂.

III. X. nach Blutentnahme.

2. Juni. Hämoglobin 50 ccm. Körpergewicht 1980 g. *Adrenalin* pro Kilogramm 0,5 mg, ganze Menge 0,99 mg. Körpertemperatur 38,5° C.

Zeit der Analyse:	1. Std.	2. Std.	3. Std.	4. Std.	5. Std.	6. Std.	7. Std.	8. Std.	9. Std.	Vor d. Injektion	Ganze Menge
Harnmenge .	24,5	21,0	25,4	15,2	4,5	3,0	1,8	1,5	1,6	0,6	96,9
Aussehen des Harns . .	leicht getrübt	klar	klar	leicht getrübt	stark getrübt	stark getrübt	stark getrübt	stark getrübt	stark getrübt	stark getrübt	
Reaktion . .	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	schw. alkal.	sauer	alkal.	
Eiweiß . . .	(—)	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) Spur	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(+) mäßig	(—)	
Zucker i. Proz.	0,625	1,4	2,45	3,05	2,75	1,3	0,8	(—)	(—)		
Zuckergew. .	153,125	294,0	622,3	463,6	123,75	39,0	14,4	(—)	(—)	(—)	1710,175

Das Hauptergebnis dieser Versuchsreihe besteht darin, daß sowohl kurze Zeit nach der Blutentnahme, wenn der Hämoglobingehalt des Blutes fast um die Hälfte vermindert ist, wie auch später, wenn er allmählich sich wieder der Norm nähert, die infolge Adrenalininjektion auftretende Glykosurie um die Hälfte geringer ist als bei normalen Tieren. Die anfängliche Verminderung des Harnzuckers kann man natürlich leicht auf zwei Momente zurückführen: 1. auf die Verminderung des Glykogenbestandes infolge des großen Versuchseingriffs und 2. auf eventuell ein vermindertes Ausscheidungsvermögen durch die Niere. Diese beiden Erklärungsmöglichkeiten versagen jedoch, sobald einige Zeit nach der Blutentnahme vergangen ist und die deutlichen Anzeichen einer Regeneration eintreten. Es scheint mir die Erklärung näher liegend, daß infolge des Blutentzuges und der als Reaktion hierauf eintretenden Stoffwechselvorgänge eine Umstimmung im Organismus eingetreten ist, welche denselben weniger empfindlich gegen Adrenalin macht. Um diese Umstimmung zu analysieren, bedarf es weiterer Untersuchungen, die in Aussicht genommen sind.

Zusammengefaßt sind die wesentlichen Resultate meiner Arbeit die nachfolgenden:

1. Normale Kaninchen scheiden nach einer einmaligen subkutanen Adrenalininjektion durchschnittlich 3000 bis 3600 mg Zucker im Harn aus.

2. Der Prozentgehalt des Zuckers im Harn schwankt mit der Harnmenge.

3. Zu junge Kaninchen sind zu diesen Versuchen nicht geeignet.

4. Mit Schilddrüsenpräparaten gefütterte Kaninchen können, wenn sie stark auf das Präparat reagieren, wesentlich schwächere Glykosurie aufweisen, die aber zeitlich viel schneller eintritt.

5. Bei anderen Tieren ist die Folge eine stärkere Glykosurie als normal.

6. Die Erscheinungen erklären sich aus der doppelten Wirkung des Schilddrüsenhormons, der Aktivierung gegenüber Adrenalin und der Verminderung des Glykogenbestandes.

7. Blutentzug und Ersatz durch Transfusion von Ringergelatinelösung ruft längere Zeit hindurch eine verminderte Reaktion auf die Adrenalininjektion hervor, sowohl in der Zeit, wo die Hämoglobinmenge noch niedrig ist, wie auch in der Zeit der deutlichen Regeneration. Die Erscheinung läßt sich als eine im Interesse des abgeänderten Stoffwechsels eingetretene Umstimmung deuten.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 60.

Erneute Untersuchung über den respiratorischen Grundumsatz normaler und milzloser Ratten.

Von

Y. Takahashi.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

Die Aufklärung der Funktionen der Milz bietet eigentümliche Schwierigkeiten, die wohl in der inneren Natur der physiologischen Leistung dieses Organs und ihrer Stellung, verkettet in dem Getriebe mit anderen Organen, beruht. Auf diese Eigenart ist schon mehrfach in den Arbeiten über die Funktionen der Milz, die aus dem Berner physiologischen Institut stammen, hingewiesen worden. Ganz besondere Schwierigkeiten bietet die Aufklärung der Rolle, welche die Milz im Stoffwechsel spielt, nicht zum mindesten deshalb, weil die erhaltenen Versuchsergebnisse zum Teil sich widersprechen. Diese Widersprüche reizen immer wieder zu erneuten Untersuchungen. *Danoff*[1]) zeigte in Versuchen an Ratten, die mit der von *Asher* eingeführten Art der Stoffwechseluntersuchung mit Hilfe des *Haldane-Gürber*schen Verfahrens ausgeführt wurden, daß nach der Entmilzung die Ratten eine Erhöhung des Stoffwechsels aufwiesen. Außerdem konnte durch die Beobachtung festgestellt werden, daß der Wasserverlust dieser Tiere ein größerer war. Auf Grund seiner Versuche gelangte *Danoff* zu dem Schluß, daß bei Vorhandensein der Milz dieselbe einen regulierend hemmenden Einfluß auf den Stoffwechsel ausübe. Gewissermaßen bestände ein gewisser Antagonismus zwischen der Schilddrüse und der Milz. Es war mit Rücksicht auf diesen Ge-

---

[1]) *Danoff*, diese Zeitschr. **93**, 44, 1919.

danken des Antagonismus, daß dann *Streuli* mit *Ashers* Methode der Prüfung der Sauerstoffempfindlichkeit von kleinen Tieren Ratten ohne Schilddrüse und Ratten ohne Milz sowie normale Ratten miteinander verglich. Er fand, daß entmilzte Ratten gegen Sauerstoffmangel empfindlicher sind als normale. Sie verhielten sich demnach ähnlich wie Ratten, die in bezug auf die Schilddrüsenfunktion überwertig gemacht worden sind. Ferner konnte er zeigen, daß, wenn er Ratten sowohl die Milz wie auch die Schilddrüse entfernte, diese sich genau wie normale verhielten, daß also gewissermaßen ein Gleichgewicht zwischen den entgegengesetzten Folgen der Entfernung der Schilddrüse und der Entfernung der Milz hergestellt worden war.

Nun liegen aber bei der Ratte hinsichtlich der Milz eigenartige Verhältnisse vor, welche die Rolle der Milz im Organismus der Ratte als eine etwas anders geartete erscheinen lassen, als sie bei anderen Tieren zu sein scheint. *Danoff* fand nämlich, daß seine entmilzten Ratten durchschnittlich nur 10 Tage lebten und dann ohne voraufgehende krankhafte Symptome plötzlich eingingen. Dieses Verhalten ist ein ganz anderes als beispielsweise das bei Hunden bekannte. Hunde vertragen die Exstirpation der Milz anscheinend ohne irgendwelche Symptome zu zeigen; darüber liegen zahlreiche Beobachtungen vor. *Großenbacher* zeigte vor vielen Jahren im Berner physiologischen Institut, daß ganz junge Hunde, denen die Milz im frühesten Lebensalter entfernt wurde, genau so gut sich entwickeln und aufwachsen wie die normalen Kontrollen. In bezug auf das Kaninchen liegt eine große Reihe von Versuchen vor, in denen die Entmilzung anstandslos vertragen wird. Andererseits gibt es auch Beobachtungen — solche sind beispielsweise von *Dubois* im Berner physiologischen Institut gemacht worden —, wo Kaninchen ohne ersichtlichen Grund etwa in der zweiten Woche nach der Milzexstirpation zugrunde gehen. Es konnte noch nicht aufgeklärt werden, woher die bei einer allerdings nicht sehr großen Zahl von Kaninchen feststellbare verminderte Resistenz gegen die Milzexstirpation herrührt. Aber selbst wenn man die Fälle von Nichtvertragen der Milzexstirpation in Rechnung zieht, bleibt doch der Unterschied zwischen dem Verhalten der Ratten und dem Verhalten anderer Tiere nach Milzexstirpation ein sehr großer. Wenn behauptet wird, daß bei zahlreichen Tieren die Milzexstirpation symptomlos vertragen wird, so soll das nur heißen, daß bei der bloßen Beobachtung unter natürlichen Bedingungen in bezug auf Lebensfähigkeit und in bezug auf das Verhalten der Tiere in allen leicht beobachtbaren Verhältnissen kein Unterschied bemerkbar ist. Es gehören feinere und kompliziertere Reaktionen dazu, um zu erkennen, daß das Fehlen der Milz nicht symptomlos an dem Organismus vorübergeht. Es sind im Berner physiologischen Institut in einer Reihe

von Arbeiten Methoden beschrieben worden, deren Anwendung geeignet war, dem Funktionieren der Milz auf die Spur zu kommen. In dieser Arbeit soll auf diese Dinge nicht eingegangen werden, sondern nur auf die Frage der Beziehung der Milz zu den allgemeinen Stoffwechselvorgängen. Deshalb soll auch nicht an dieser Stelle auf diejenigen Arbeiten des Berner physiologischen Instituts eingegangen werden, die mit Hilfe komplizierterer und gewissermaßen mittelbarer Methoden dem etwaigen Einfluß der Milz auf Teilvorgänge des Stoffwechsels nachgingen.

Kehren wir zur Ratte zurück, so liegen außer den oben genannten Arbeiten noch die schönen Untersuchungen von *Lepehne*[1]) vor, welcher mit histologischen Methoden außerordentliche Veränderungen in Organen der Ratte nachwies, nachdem denselben die Milz exstirpiert worden war. Derartige große histologisch erkennbare Veränderungen gestatten die Annahme, daß bei der Ratte spezialisierte Verhältnisse vorliegen, die nicht ohne weiteres auf andere Tiere übertragen werden können. Dies war der Grund, warum *Doubler*[2]) und *Koda*[3]) erneut am Hunde den Einfluß der Milzexstirpation auf den Stoffwechsel untersuchten. Beide bedienten sich des *Jaquet*schen Respirationsapparates und bestimmten in bekannter Weise den Sauerstoffverbrauch und die Kohlensäurebildung. Beide Autoren fanden, daß der Grundumsatz des normalen und des milzlosen Hundes genau der gleiche war. Jedes einzelne Tier wurde vor und nach der Entmilzung unter den gleichen Bedingungen untersucht. Um ganz sicher zu gehen, wurde auch ein Vergleich bei eisenarmer Nahrung angestellt, auf Grund der Erfahrung aus dem *Asher*schen Institut, daß gewisse Symptome des Fehlens der Milz nur dann zum Ausdruck gelangen, wenn die Ernährung eisenarm oder eisenfrei ist. Aber auch beim eisenarm ernährten Hunde vermochte innerhalb der Zeit, welche für die Versuche zur Verfügung stand, die Entmilzung keinen Einfluß auf den respiratorischen Stoffwechsel auszuüben, weder im Sinne der Erhöhung noch im Sinne der Verminderung.

Es schien nach den eben mitgeteilten Erfahrungen geraten zu sein, noch einmal an der Ratte den etwaigen Einfluß der Entmilzung auf den Stoffwechsel zu überprüfen und auch noch ein anderes Tier, nämlich das Meerschweinchen, zur Untersuchung mit heranzuziehen. Diese Untersuchung habe ich auf Vorschlag von Prof. *Asher* nach seinen Plänen durchgeführt.

Was die Methode betrifft, so sind die Respirationsversuche an der Ratte sowie diejenigen am Meerschweinchen nach der öfters beschriebenen Methode des Berner physiologischen Instituts ausgeführt worden, so daß

---

[1]) *Lepehne*, Zieglers Beiträge **64**, 55, 1917.
[2]) *Doubler*, diese Zeitschr. **122**, 161, 1921.
[3]) *Koda*, ebendaselbst **122**, 154, 1921.

ich über die Berechnung des Grundumsatzes, die außerdem noch klar aus den Versuchsprotokollen hervorgeht, nichts weiter zu bemerken habe. Nur eins möchte ich an dieser Stelle erwähnen, daß ich strenge darauf gehalten habe, keinen Versuch, der berechnet wird, anzustellen, als bis durch Voruntersuchung das betreffende Tier auf konstanten Grundumsatz gebracht worden ist. Das geht bei einigen Tieren sehr rasch in wenigen Tagen, bei anderen Tieren dauert es aber länger. Ist aber einmal der gewünschte Zustand der Konstanz des Grundumsatzes erreicht, so ist er von einer geradezu wunderbaren Gleichmäßigkeit. In Anbetracht des Umstandes, daß *Richet* in seinen Untersuchungen einen gesteigerten Eiweißumsatz infolge der Milzexstirpation fand — die Versuche wurden an Hunden angestellt —, habe ich auch in einer Anzahl von Fällen den Stickstoffumsatz der Ratten ermittelt. Die Ratten wurden zu diesem Zwecke auf Netze gesetzt, die auf einer Porzellanschale ruhten. Die Siebgröße der Netze war so, daß der Kot auf dem Netz liegt und nur der Harn in die Porzellanschale ablief. Die Nahrung wurde in Steinguttrögen gereicht, die so aufgehangen wurden, daß niemals Nahrungsbestandteile auf das Drahtnetz oder in die Porzellanschale gelangen konnten. Der Harn wurde quantitativ aus den Schalen entleert und auf ein bekanntes passendes Volumen gebracht. Die Stickstoffbestimmung geschah nach der Mikromethode von *Abderhalden*. Eine spezielle methodische Anordnung werde ich im Laufe der Arbeit erwähnen.

Die *Versuche der ersten Reihe* beschäftigen sich mit dem Vergleich des respiratorischen Stoffwechsels der normalen und der milzlosen Ratte. In diesen Versuchen wurden zwei Variable eingeführt, nämlich einmal die Ernährung nur mit Milch, um den Stoffwechsel bei einer sehr eisenarmen Nahrung zu untersuchen; zweitens mit einer Nahrung, bestehend aus Milch unter Zusatz von Eisen, um hierdurch zu prüfen, ob die Verhütung des Eisenverlustes infolge Fehlens der Milz einen Einfluß auf das Verhalten des milzlosen Tieres ausübt. In den meisten Versuchen dieser Reihe wurde auch die Stickstoffausscheidung im Harn bestimmt.

In der Versuchsreihe 1 (Tabelle I) wurde eine kleine weiße Ratte nach Erreichung eines konstanten Grundumsatzes 7 Tage lang, natürlich mit eingeschobenen Intervallen, an denen das Tier ernährt wurde, untersucht. Die Mittelwerte dieser Reihe betrugen: Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und pro Stunde 3,54 g, Kohlensäure pro Kilogramm und pro Stunde 3,61 g. Der respiratorische Quotient betrug im Mittel 0,745. Nach der Entmilzung wurde das Tier an acht verschiedenen Tagen untersucht. Die achte Untersuchung geschah am 19. Tage nach der Milzexstirpation, wo das Tier sich in gutem Zustande befand. Das Tier hatte sogar an Gewicht zugenommen, denn es wog 152 g gegen 123 g am dritten Tage nach der Operation. Die Mittelwerte betrugen an Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde 2,82 g, also 19,78 Proz. Verminderung gegenüber dem Normalzustande: Kohlensäureverbrauch pro Kilogramm und Stunde 2,88 g, also 17,73 Proz. Verminderung. Der respiratorische Quotient belief sich auf 0,759, ist also praktisch gleich mit demjenigen vor der Entmilzung. Es zeigt sich also in dieser Versuchsreihe ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Danoff* eine Verminderung des respiratorischen Grundumsatzes infolge der Entmilzung. Was die Stickstoffausscheidung im Harn anbetrifft, so betrug

sie *vor* der Entmilzung täglich im Durchschnitt 0,130 g, nach der Entmilzung 0,122 g. Also auch hinsichtlich des Eiweißumsatzes fand sich eine Verminderung von 18,26 Proz.

In der *nächsten Versuchsreihe* (Tabelle II) wurde das Versuchstier vor und nach der Entmilzung mit Milch oder Zusatz von Eisen, und zwar Eisenlactat, ernährt.

In der neuntägigen Periode vor der Operation betrug durchschnittlich der Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und pro Stunde 3,17 g, die Kohlensäurebildung 3,32 g pro Kilogramm und pro Stunde, der respiratorische Quotient 0,735, die Gesamtstickstoffmenge im Harn 0,118 g. Nach der Entmilzung wurde an drei verschiedenen Tagen, am dritten, fünften und sechsten Tage nach der Operation, das Tier untersucht. Durchschnittlich betrug der Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde 3,03 g, die Kohlensäurebildung 3,09 g, der respiratorische Quotient 0,743, die Stickstoffausscheidung im Harn betrug 0,199 g. Demnach ist der respiratorische Stoffwechsel um ein kleines vermindert: 4,11 Proz. beträgt die Verminderung des Sauerstoffs, 3,74 Proz. diejenige der Kohlensäure und 0,27 Proz. derjenige des respiratorischen Quotienten. Hingegen ist die Stickstoffausscheidung gesteigert. Die Unterschiede des Grundumsatzes sind immerhin so geringfügig, daß man von einer Konstanz des Grundumsatzes vor und nach der Entmilzung sprechen kann. Man könnte auf die Vermutung kommen, daß der Zusatz von Eisen in der Nahrung die in der voraufgehenden Versuchsreihe beobachtete Verminderung des Grundumsatzes unterdrückt habe. Daß diese Vermutung aber nicht zutreffend ist, zeigt die nächste Versuchsreihe. Andererseits ist es beachtenswert, daß in dieser Versuchsreihe der Eiweißumsatz nach der Entmilzung erhöht ist. Aber auch dies hängt nicht von dem Eisenzusatz in der Nahrung ab.

In Tabelle III teile ich einen weiteren Versuch mit, in welchem der Stoffwechsel der normalen und der milzlosen, nur mit Milch genährten Ratte verglichen wird. Ich will auf die in der Tabelle niedergelegten Zahlen nicht im einzelnen eingehen, da die Resultate sehr klar sind. Der respiratorische Umsatz ändert sich, praktisch gesprochen, gar nicht. Hingegen ist eine sehr merkliche Steigerung des Eiweißumsatzes feststellbar, indem die durchschnittliche Stickstoffausscheidung im Harn nach der Entmilzung um 42 Proz. größer ist als vorher.

Der *nächste Versuch* (Tabelle IV) stellt eine Reihe dar, wo erst das Tier vor der Entmilzung, dann nach der Entmilzung mit einer Fütterung von Brot, Milch und Eisen ernährt wurde, und dann in einer fortgesetzten Periode das milzlose Tier nur mit Brot und Milch ohne Eisen ernährt wurde.

Das Brot, welches der Milchnahrung zugesetzt wurde, war ein besonders vom Bäcker gebackenes Milchbrot. Zunächst will ich bemerken, daß in dieser Versuchsreihe das Tier bis zum 24. Tage nach der Milzentfernung in vollkommen gesundem Zustande untersucht wurde. In diesem Versuche ist demnach erneut ein Unterschied gegenüber den Erfahrungen von *Danoff* und von *Lepehne* festzustellen. Ob der Unterschied ein solcher ist, der von individuellen Eigenschaften der Ratte abhängt, oder davon abhängt, daß ich meine Tiere mit Milch ernährt habe (was *Danoff* nicht getan hatte), habe ich nicht in den Bereich meiner Untersuchungen gezogen. In dieser Ver-

suchsreihe zeigt sich nun überraschenderweise, daß die Entmilzung den respiratorischen Umsatz erhöht, indem der Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde in der Zeit, wo das Tier ohne Eisen nach der Milzexstirpation ernährt wird, um 15 Proz., die Kohlensäurebildung um 13 Proz. gegenüber der Norm erhöht ist. In der Periode ohne Eisen betragen die beziehentlichen Vermehrungen 11 und 19 Proz.; hingegen ist der Eiweißumsatz der milzlosen Ratte, solange sie mit Eisen ernährt wird, normal, bei der Ernährung ohne Eisen jedoch um 14 Proz. vermindert.

Es ist der einzige Versuch dieser Reihe, bei welchem eine deutliche Steigerung des respiratorischen Grundumsatzes stattgefunden hat, und dabei ist dieser Versuch als ein besonders gelungener zu bezeichnen, weil die Ratte die Exstirpation der Milz so anstandslos vertragen hat.

In dem *nächsten Versuche* (Tabelle V) zeigt sich dasselbe Resultat wie in den früheren Versuchen, nämlich: eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs pro Kilogramm und Stunde nach der Entmilzung um 13,6 Proz., der Kohlensäurebildung um 14,42 Proz., während die Stickstoffausscheidung um 22 Proz. erhöht ist. In dieser Versuchsreihe wurde das Tier mit Milch und Brot ernährt.

Überblicke ich diese Versuche, so ergeben sich in der Mehrzahl, nämlich in vier Fällen, eine Verminderung, und nur in einem Falle eine Steigerung des respiratorischen Grundumsatzes. Da alle Versuche unter gleichen Bedingungen angestellt worden sind und Fehlerquellen nicht erkennbar werden, leuchtet die ganze Schwierigkeit, den eigentlichen Sachverhalt zu erkennen, klar hervor. Jedenfalls ist so viel sicher, daß das Resultat von *Danoff* auch für die Ratte keine Allgemeingültigkeit besitzt.

Ich berichte sodann über zwei Versuchsreihen (Tabellen VI und VII), die ich an Meerschweinchen angestellt habe. Bei dem ersten Versuche betrug durchschnittlich der Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und pro Stunde vor der Operation 2,82 g, die Kohlensäurebildung pro Kilogramm und pro Stunde 2,94 g, der respiratorische Quotient 0,755. Nach der Entmilzung betrug durchschnittlich der Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde 2,51 g, die Kohlensäurebildung 2,66 g, der respiratorische Quotient 0,77. Der respiratorische Grundumsatz war demnach um 12,4 bzw. 10,5 Proz. vermindert.

Analog liegen die Verhältnisse im zweiten Versuche, wo der Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde 2,53, die Kohlensäurebildung 2,62 g, der respiratorische Quotient 0,759 vor der Operation betrug gegen 2,25 bzw. 2,48 g bzw. 0,800 nach der Operation. Also eine Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs um 12,44, während die Kohlensäurebildung nur um 5,66 Proz. vermindert ist. Das erste Tier konnte noch am siebenten Tage, das zweite Tier am sechsten Tage nach der Operation untersucht werden. Dann aber starben die Tiere einige Tage darauf.

Tabelle I.

Versuch des respiratorischen Stoffwechsels und des Sauerstoffmangels an der normalen und an der milzlosen, mit Milch ernährten Ratte.
Kleine weiße Ratte.

Nr.	Datum	Dauer des Versuchs	Temperatur	Fütterung	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Harnmenge in 24 Stunden ccm	Gesamte N-Menge im Harn ccm	Bemerkungen
							Vor der Operation.							
1	9. II.	3	21—22	40 ccm Milch, 7 g Brot	1,36	1,55	1,52	0,736	3,62	3,58	106,19	15	0,12105	
2	11. II.	3	21—20		0,81	1,32	1,31	0,732	4,05	4,01	108,54	13	0,13134	
3	12. II.	3	20—19		0,79	1,42	1,40	0,742	4,05	3,98	117,12	10	0,11208	
4	14. II.	3	20—21		0,79	1,18	1,16	0,739	3,45	3,39	114,05	11	0,12945	
5	16. II.	3	20—21		0,84	1,16	1,15	0,733	3,35	3,32	115,49	12	0,13225	
6	21. II.	3	20—21		0,76	1,23	1,16	0,770	3,30	3,19	124,59	14	0,14010	
7	20. II.	3	21—20		0,71	1,29	1,23	0,762	3,48	3,32	123,59	21	0,14711	
						Mittelwert:		0,745	3,61	3,54	115,64	14	0,13048	
							Nach der Entmilzung.							
1	27. II.	3	20	40 ccm Milch, 7 g Brot	0,57	1,15	1,05	0,796	3,10	2,83	123,77	13	0,09340	am 3. Tage nach der Operation
2	1. III.	3	21		0,73	1,05	1,01	0,755	2,82	2,72	123,99	24	0,13076	am 5.
3	2. III.	3	22		0,60	1,03	0,98	0,726	2,74	2,61	125,13	17	0,16065	am 6.
4	3. III.	3	22		0,42	1,02	0,93	0,796	2,72	2,48	124,92	—	—	am 7.
5	4. III.	2,5	22		0,69	0,96	0,90	0,775	2,88	2,70	133,31	—	—	am 8.
6	10. III.	2,5	23		0,32	0,90	0,86	0,760	3,04	2,90	148,08	18	0,13630	am 14.
7	13. III.	2,5	20		0,58	1,32	1,30	0,738	2,87	2,84	152,84	15	0,14944	am 17.
8	15. III.	2,5	20		0,38	1,35	1,34	0,730	2,94	2,92	152,84	20	0,14944	am 19.
						Mittelwert:		0,759	2,88	2,82	135,61	17	0,12203	
	Vergleich mit vcr der Operation in Prozenten							+1,61	-17,73	-19,78	—	+ 20	— 18,26	+ vermehrt — vermindert

Tabelle II.

Versuch des respiratorischen Stoffwechsels und des Sauerstoffmangels an der normalen und an der milzlosen, mit Milch und Eisen ernährten Ratte.

Schwarze Ratte.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	H_2O-Bildung	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Harnmenge in 24 Stunden ccm	Gesamte N-Menge im Harn ccm	Bemerkungen
						Vor der Operation.								
1	13. II.	40 ccm Milch, 7,0 g Brot, 0,04 g Eisen	3	22	1,43	1,42	1,00	0,711	2,95	2,93	161,64	13	0,13659	
2	15. II.		3	20	1,47	1,45	0,89	0,736	3,15	3,11	155,43	15	0,14297	
3	17. II.		3	23	1,58	1,55	0,65	0,740	3,32	3,26	158,32	18	0,10638	
4	20. II.		3	25	1,80	1,77	0,72	0,739	3,98	3,91	150,65	—	—	
5	23. II.		3	22	1,34	1,31	0,45	0,743	2,81	2,75	159,95	10	0,05010	
6	28. II.		3	24	1,47	1,44	0,95	0,742	3,19	3,13	153,42	—	—	
7	1. III.		3	21	1,19	1,16	0,61	0,745	2,69	2,63	147,28	9	0,18119	
8	12. III.		4	23	2,27	2,25	0,83	0,730	3,32	3,29	170,88	—	—	
9	13. III.		4	20	2,30	2,28	0,90	0,736	3,48	3,43	168,67	10	0,09178	
							Mittelwert:	0,735	3,32	3,17	158,47	13	0,11816	
						Nach der Operation (milzlose Ratte).								
1	17. III.	40 ccm Milch, 10 g Brot, 0,04 g Eisen	2,5	19	1,23	1,18	0,47	0,757	2,96	2,84	145,99	25	0,22042	am 3. Tage nach der Operation
2	19. III.		3	21	1,34	1,33	0,61	0,732	3,03	3,01	147,16	15	0,19240	am 5. Tage nach der Operation
3	20. III.		4	20	1,75	1,72	1,00	0,739	2,29	3,23	133,42	10	0,18680	am 6. Tage nach der Operation
							Mittelwert:	0,743	3,09	3,03	142,16	17	0,19987	
	Vergleich mit vor der Operation in Prozenten							0,27	3,74	4,11	—	—	—	vermindert

Tabelle III.

Versuch des respiratorischen Stoffwechsels und des Sauerstoffmangels an der normalen und an der milzlosen, nur mit Milch ernährten Ratte.

Große weiße Ratte.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Harnmenge in 24 Stunden ccm	Gesamte N-Menge im Harn ccm	Bemerkungen
							Vor der Operation.							
1	12. II.	50 ccm Milch, 10 g Brot	3	22	1,22	2,18	2,09	0,757	2,67	2,56	271,83	15	0,18073	
2	14. II.		3	24	0,88	1,84	1,82	0,734	2,36	2,34	259,49	19	0,18306	
3	16. II.		3	23	0,82	2,26	2,22	0,740	2,96	2,89	225,71	18	0,18156	
4	19. II.		3	22	0,97	1,96	1,85	0,766	2,56	2,44	253,71	16	0,16517	
5	22. II.		3	20	0,50	1,84	1,83	0,730	2,46	2,44	249,58	20	0,15691	
6	24. II.		3	22	0,73	1,67	1,63	0,735	2,25	2,18	249,44	10	0,15341	
7	27. II.		3	21	0,92	1,82	1,78	0,743	2,42	2,37	250,32	15	0,16182	
		Mittelwert:		22	0,86	1,93	1,89	0,744	2,52	2,48	251,44	16	0,16895	
							Nach der Entmilzung.							
1	5. III.	50 ccm Milch, 10 g Brot	3	22	0,77	1,75	1,71	0,743	2,46	2,40	237,49	20	0,22229	am 3. Tage nach der Operation
2	6. III.		4	22	0,98	2,22	2,21	0,740	2,52	2,47	223,54	21	0,25778	am 4. Tage nach der Operation
							Mittelwert:	0,742	2,49	2,44	230,52	21	0,24004	
	Vergleich mit vor der Operation in Prozenten							— 0,27	— 1,79	— 1,61	—	+ 32,25	+ 42,07	+ vermehrt — vermindert

Tabelle IV. **Versuch des respiratorischen Stoffwechsels und des Sauerstoffmangels an der normalen u. der milzlosen Ratte.**

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Harnmenge in 24 Stunden ccm	Gesamte N-Menge im Harn ccm	Bemerkungen
						Vor der Operation.								
2	19. IV.	10,0 g Brot, 50 ccm Milch, 0,04 g Eisen	3	22	0,63	1,45	1,36	0,775	3,08	2,89	156,99	24	0,11548	
4	21. IV.		3	23	0,41	1,30	1,27	0,743	2,91	2,84	149,10	17	0,08593	
6	23. IV.		3	22	0,80	1,39	1,30	0,777	3,04	2,85	152,28	15	0,07472	
9	25. IV.		3	23	0,67	1,41	1,38	0,742	3,24	3,12	145,32	14	0,17395	
10	26. IV.		4	22	0,68	1,72	1,69	0,738	3,12	3,06	138,01	12	0,19713	
12	27. IV.		4	22	0,56	1,73	1,70	0,739	3,13	3,07	138,28	13	0,16031	
16	30. IV.		3	22	0,41	1,32	1,30	0,738	3,21	3,16	136,81	12	0,19247	
20	2. V.		3	22	0,51	1,42	1,40	0,738	3,47	3,43	136,23	16	0,14010	
							Mittelwert:	0,748	3,15	3,05	144,13	15	0,14149	
			Nach der Entmilzung.			Fütterung: Brot, Milch und Eisen.								
23	7. V.	10,0 g Brot, 50 ccm Milch, 0,04 g Eisen	4	24	1,07	1,86	1,85	0,730	3,55	3,51	130,90	20	0,10274	am 3. Tage nach der Operation
24	8. V.		4	24	0,89	1,92	1,82	0,768	3,77	3,57	127,30	11	0,10314	am 4.
26	9. V.		2	23	0,62	1,14	1,06	0,781	4,59	4,40	124,13	17	0,14197	am 5.
28	11. V.		3	23	0,72	1,35	1,29	0,760	3,47	3,32	129,62	17	0,06351	am 7.
30	12. V.		3	23	0,58	1,26	1,21	0,756	3,25	3,12	129,15	17	0,08780	am 8.
31	14. V.		4	23	1,10	1,80	1,69	0,774	3,42	3,21	131,46	14	0,13076	am 10.
32	15. V.		5	22	1,44	2,25	2,16	0,757	3,42	3,28	131,60	14	0,13229	am 11.
33	16. V.		4	23	1,06	1,84	1,79	0,747	3,82	3,45	130,51	18	0,16625	am 12.
34	17. V.		4,5	22	0,92	2,12	2,09	0,737	3,69	3,63	127,80	10	0,18788	am 13.
37	19. V.		2	22	0,32	1,02	1,01	0,737	3,65	3,61	131,97	18	0,12516	am 15.
							Mittelwert:	0,755	3,58	3,51	129,45	15	0,14415	
			Dieselbe Ratte.			Fütterung: Brot und Milch, kein Eisen.								
39	22. V.	10 g Brot, 50 ccm Milch, kein Eisen	3	22	0,69	1,74	1,71	0,739	4,18	4,10	138,82	22	0,12516	am 18. Tage nach der Operation
40	23. V.		4	20	0,75	1,97	1,96	0,730	3,59	3,58	136,85	15	0,12142	am 19.
43	24. V.		4	22	1,18	1,95	1,89	0,749	3,61	3,50	135,05	15	0,10021	am 20.
44	25. V.		4	22	0,91	2,11	2,07	0,740	3,95	3,88	133,30	24	0,14944	am 21.
45	26. V.		2,5	20	0,40	1,23	1,18	0,757	3,67	3,52	134,12	—	—	am 22.
46	28. V.		4	21	0,67	2,09	2,05	0,741	3,64	3,57	143,64	—	—	am 24.
							Mittelwert:	0,743	3,77	3,69	136,91	19	0,12405	
			Vergleich des Einflusses der Entmilzung, ausgedrückt in Prozenten.											
			Mit Eisen ernährte Ratte					+ 0,93	+ 13,65	+ 15,08	—	gleich	+ 1,81	+ vermehrt
			Ohne Eisen ernährte Ratte					— 0,67	+ 19,68	+ 11,08	—	+ 26,66	— 14,06	— vermindert

Tabelle V.

Versuch des respiratorischen Stoffwechsels und des Sauerstoffmangels an der normalen und an der milzlosen, nur mit Milch und Brot ernährten Ratte.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Harnmenge in 24 Stunden ccm	N-Menge im ganzen Harn g	Bemerkungen
							Vor der Operation.							
3	20. IV.	10 g Brot, 50 ccm Milch	4	24	1,00	2,13	2,03	0,762	2,31	2,20	230,48	20	0,15878	
8	24. IV.		3	22	0,39	1,61	1,59	0,736	2,26	2,23	237,61	17	0,12703	
11	26. IV.		3	22	0,30	1,67	1,63	0,744	2,40	2,35	231,61	17	0,17186	
14	28. IV.		2	22	0,30	1,11	1,09	0,740	2,44	2,40	227,00	20	0,14010	
17	1. V.		4	23	1,09	1,96	1,89	0,754	2,12	2,05	230,57	18	0,18306	
19	2. V.		4	23	0,81	2,10	2,08	0,733	2,28	2,26	229,79	10	0,15274	
21	3. V.		4	22	0,66	2,07	2,04	0,737	2,26	2,24	227,57	13	0,15252	
							Mittelwert:	0,744	2,30	2,25	230,63	16	0,15515	
							Nach der Entmilzung.							
25	8. V.	10 g Brot, 50 ccm Milch	3	24	0,87	1,28	1,28	0,725	2,05	2,05	208,12	11	0,19987	am 4. Tage nach der Operation
27	9. V.		4	23	0,91	1,67	1,63	0,740	2,08	2,03	200,37	11	0,18306	am 5. Tage nach der Operation
29	11. V.		4	23	0,85	1,46	1,42	0,748	1,90	1,85	192,00	24	0,18593	am 7. Tage nach der Operation
							Mittelwert:	0,738	2,01	1,98	200,16	15	0,18962	
Vergleich mit Versuch am Normaltier in Prozenten								—0,81	—14,42	—13,63	—	—0,66	+22,21	+ vermehrt, — vermindert

Tabelle VI. Versuch des respiratorischen Stoffwechsels und des Sauerstoffmangels an dem normalen und an dem milzlosen Meerschweinchen. — Stirnschwarzes Meerschweinchen.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht des Meerschweinchens	Bemerkungen
					Normaler Versuch vor der Operation.							
1	23. V.	gewöhnlich	4	22	0,96	2,44	2,36	0,751	2,99	2,89	204,25	
2	29. V.		4	22	0,83	2,17	2,08	0,757	2,90	2,78	187,85	
3	6. VI.		4	21	0,52	2,15	2,05	0,761	2,95	2,82	181,20	
4	8. VI.		3	21	0,60	1,59	1,53	0,755	2,92	2,81	181,25	
							Mittelwert:	0,755	2,94	2,82	188,64	
					Nach der Entmilzung.							
5	13. VI.	gewöhnlich	4	20	1,00	1,73	1,63	0,771	2,57	2,42	168,26	am 4. Tage nach der Operation
6	14. VI.		4	23	1,09	1,63	1,53	0,779	2,70	2,52	150,50	am 5. Tage nach der Operation
7	16. VI.		2,5	20	0,42	0,90	0,86	0,768	2,54	2,43	141,62	am 7. Tage nach der Operation
8	18. VI.		3	21	0,43	1,07	1,01	0,769	2,84	2,68	125,52	am 9. Tage nach der Operation
							Mittelwert:	0,772	2,66	2,51	146,48	
Vergleich mit Versuch am Normaltier, ausgedrückt in Prozenten:								+2,25	-10,52	-12,35	—	+ vermehrt, — vermindert

Tabelle VII. Versuch des respiratorischen Stoffwechsels und des Sauerstoffmangels an dem normalen und an dem milzlosen Meerschweinchen. — Kopfschwarzes Meerschweinchen.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht des Meerschweinchens	Bemerkungen
					Normaler Versuch vor der Operation.							
1	5. VI.	gewöhnlich	3	21	0,94	2,79	2,66	0,762	2,82	2,79	318,09	
2	6. VI.		4	22	1,06	3,17	3,06	0,753	2,74	2,65	288,98	
3	8. VI.		4	20	0,58	2,94	2,80	0,763	2,50	2,38	294,13	
4	11. VI.		4	21	1,49	2,54	2,42	0,762	2,59	2,46	245,60	
5	12. VI.		4	20	1,16	2,31	2,22	0,756	2,44	2,35	236,02	
							Mittelwert:	0,759	2,62	2,53	276,56	
					Nach der Entmilzung.							
6	15. VI.	gewöhnlich	4	21	1,01	2,35	2,14	0,798	2,42	2,21	242,57	am 3. Tage nach der Operation
7	16. VI.		4	20	0,82	2,22	2,02	0,798	2,48	2,25	224,25	am 4. Tage nach der Operation
8	18. VI.		3	21	0,69	1,46	1,31	0,804	2,53	2,27	192,53	am 6. Tage nach der Operation
							Mittelwert:	0,800	2,48	2,25	226,45	
Vergleich mit Versuch am Normaltier, ausgedrückt in Prozenten:								+5,40	—5,64	-12,44	—	+ vermehrt, — vermindert

Überblickt man die Gesamtheit meiner Versuche, so kommt man zu dem Schluß, daß in weitaus der Mehrzahl der Fälle die Milzexstirpation zu einer Herabsetzung des Grundumsatzes führt, dem nur ein einziger Fall von Erhöhung entgegensteht, während, was den Eiweißumsatz anlangt, immerhin in einer Anzahl von Fällen eine Steigerung feststellbar ist, denen allerdings auch einige Fälle von Verminderung entgegenstehen.

Ich habe schon erwähnt, daß die Verhältnisse hinsichtlich der Milz recht verwickelte sind, und die Widersprüche zwischen meinen Ergebnissen und denjenigen früherer Bearbeiter können nur dazu beitragen, diese Schwierigkeiten noch zu vermehren. Handelte es sich nur darum, aus dem respiratorischen Grundumsatz Schlüsse zu ziehen, so wäre ich geneigt, meinen Versuchen mehr Gewicht beizulegen als denjenigen von *Danoff*, weil ich in einigen Fällen Tiere untersucht habe, die viel länger lebten als diejenigen von *Danoff*. Aber es gibt andere Erfahrungen, die in der gleichen Richtung liegen, wie diejenigen von *Danoff*, und die mit ganz anderen Methoden gewonnen worden sind. Ich meine nämlich die Erfahrungen von *Streuli* und diejenigen von *Dubois*, die alle am einfachsten unter dem Gesichtspunkte sich verständlich machen lassen, daß die milzlose Ratte einen anderen respiratorischen Umsatz hat als das normale Tier, und zwar im Sinne einer verminderten Resistenz gegenüber Sauerstoffmangel, ähnlich wie im Zustande der experimentellen Hyperthyreose. Auch hatten andere Erfahrungen am Berner physiologischen Institut gezeigt, daß man erst durch Ausarbeitung einer Methodik, die mehrere Faktoren des Stoffwechsels in ihrer Verkettung berücksichtigt, den Symptomen des Mangels der Milz einigermaßen näher kommt. Es waren derartige Erwägungen, welche dazu veranlaßten, daß ich ein neues, von Prof. *Asher* vorgeschlagenes Versuchsverfahren anwandte, um den Einfluß der Milz auf den respiratorischen Grundumsatz aufzuklären. Das Verfahren sei bezeichnet als die differentielle Methode des respiratorischen Stoffwechselversuchs und des Sauerstoffmangels. Dem Verfahren liegt folgender Gedankengang zugrunde. Es war gezeigt worden, daß normale, milzlose Ratten sich gegenüber Sauerstoffmangel verschieden verhalten. Demzufolge sollten Respirationsversuche bei relativem Sauerstoffmangel angestellt werden. Es zeigte sich, daß gerade das *Haldane*sche Verfahren verhältnismäßig leicht die Anordnung zum Ablauf des Respirationsversuchs bei Sauerstoffmangel zu treffen gestattete. Es wurden einfach den Flaschen, die vor dem Apparate lagen, um Kohlensäure und Wasser der eintretenden Luft zu entfernen, Flaschen, die Pyrogallol enthielten, vorgelagert. Diese Flaschen dienten zur teilweisen Entfernung des Sauerstoffs. Es kostete einige Mühe, das Verfahren so auszuarbeiten, daß die Sauerstoffentfernung einmal hinreichend

war, und andererseits nicht zu ergiebig, um das Leben der Tiere zu gefährden. Da es nicht möglich war, das Sauerstoffdefizit der durch die Kammer streichenden Luft analytisch zu bestimmen, wurde das Verfahren differentiell angewendet, d. h. nachdem die Luft durch die Flaschen zur Sauerstoffverarmung und durch die Flaschen zur Kohlensäure- und Wasserentfernung gestrichen war, gabelte sich die Leitung zu zwei parallel liegenden Respirationskammern und Absorptionsgefäßen. In die eine Kammer kam das normale Tier, in die andere Kammer das milzlose Tier. Es wurde durch die Einrichtung der Absorptionskörper und die Zuleitungsröhren dafür gesorgt, daß der Widerstand in beiden Systemen, demnach die Ventilation in beiden, die gleiche war. Es wurde auf diese Weise erreicht, daß gleichzeitig ein normales und ein milzloses Tier unter den gleichen Bedingungen des Sauerstoffmangels untersucht wurde. Die Versuche mit dieser differentiellen Methode wurden derart angeordnet, daß zunächst zwei Ratten, die eine als Versuchsratte, die andere als Kontrollratte, in die differentielle Apparatur gelangten und so unter gleichen Bedingungen deren normaler Grundumsatz ermittelt wurde. Hierauf wurden sie gleichzeitig im normalen Zustande dem Sauerstoffmangel unterworfen, sodann habe ich das eine Tier entmilzt. Nach der Entmilzung wurde das Versuchstier und die Kontrollratte unter dem Einfluß des Sauerstoffmangels differentiell untersucht.

Ehe ich auf die Ergebnisse der Respirationsversuche eingehe, will ich auf die Beobachtungen zu sprechen kommen, die man bei diesen Versuchen mit bloßem Auge machen kann, die in mancher Beziehung aufschlußreicher als die Methode des Stoffwechsels selber sind. Es zeigte sich nämlich, daß unter dem Einfluß des Sauerstoffmangels jederzeit die milzlosen Ratten mehr litten als die Normalratten, was aus der Atmung und aus der Unruhe der Tiere ersichtlich wird. Ich habe sogar einige Tiere im Anfang verloren, als ich noch mit zu großem Sauerstoffmangel arbeitete. Alle Verluste betrafen ausschließlich die milzlosen Tiere. Ich habe also auf diese Weise mit einer etwas anderen Methode genau das gleiche Resultat erreicht, wie seinerzeit *Streuli*. Wegen dieser theoretisch wichtigen Erscheinung mußte ich auch mit dem Grade des Sauerstoffmangels heruntergehen, damit nicht etwa durch Unruhe des Tieres die Gewinnung des Grundumsatzes unmöglich wurde. Es ist klar, daß durch diesen Umstand die Versuche nicht so leicht sind wie die anderen, und es bedarf einer großen Sorgfalt, um gerade das Richtige zu treffen.

Es ergab sich, daß der Sauerstoffmangel an beiden Tieren, solange sie noch unversehrt waren, die gleiche Steigerung des respiratorischen Stoffwechsels herbeiführte, nämlich bei der Versuchsratte 4,87 Proz. für den Sauerstoffverbrauch und 7,27 Proz. für die Kohlensäurebildung.

Bei der Kontrollratte 3,87 bzw. 5,24 Proz. Nach der Entmilzung stieg bei dem milzlosen Tiere gegenüber dem Normaltiere der Sauerstoffverbrauch um 8,6 Proz., die Kohlensäurebildung um 17,69 Proz. Um auszuschließen, daß der Unterschied zwischen diesen beiden Tieren nicht auf individuellen Momenten beruhe, wurde später das Kontrolltier auch entmilzt und dessen respiratorischer Stoffwechsel bei Sauerstoffmangel untersucht. Es ergab sich gegenüber dem Grundumsatz bei Atmung normaler Luft eine prozentische Steigerung des Sauerstoffverbrauchs um 17,64 Proz. und der Kohlensäurebildung von 23 Proz. Auch die respiratorischen Quotienten waren in beiden Fällen etwas erhöht, was natürlich auf Rechnung des Umstandes, daß die Kohlensäureausscheidung mehr vermehrt war als der Sauerstoffverbrauch, zu setzen ist.

Die Versuche mit der Differentialmethode zeigen deutlich einen Einfluß der Entmilzung auf den Stoffwechsel des Tieres bei Sauerstoffmangel. Es ist der Grundumsatz infolge der Entmilzung bei Sauerstoffmangel deutlich gesteigert. Dies ist um so evidenter, als in beiden Versuchsreihen die Entmilzung bei Atmung unter normalen Bedingungen eine Verminderung des Grundumsatzes wie in den meisten meiner früheren Versuche zur Folge hatte. Nun zeigt sich, daß die Kohlensäureausscheidung mehr gesteigert ist als der Sauerstoffverbrauch, was darauf hinweist, daß eine wesentliche Komponente in der Atmung gelegen sein könnte. Allerdings handelt es sich nicht um kurz dauernde Versuche, in denen man ja sehr vorsichtig in bezug auf Rückschlüsse auf den Grundumsatz sein muß, da bei kurz dauernden Versuchen der Einfluß der Atemmechanik ein sehr bedeutsamer ist. Alle meine Versuche dauerten 3 bis 4 Stunden, der kürzeste 2½ Stunden. Aus diesem Grunde kann nur ein Teil der vermehrt ausgeschiedenen Kohlensäure auf der verstärkten Ventilation beruhen, und ich glaube, man wird nicht umhin können, anzuerkennen, daß bei Sauerstoffmangel ein Symptom des Milzausfalles in einem vermehrten und geänderten Grundumsatz sich offenbart (s. Tabelle VIII a. S. 146 u. 147).

Das Ergebnis meiner bisherigen Versuche stellt einen Sachverhalt dar, welcher nicht einfach ist und der näheren Analyse bedarf. In den unkomplizierten Versuchen findet sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle Herabsetzung des Grundumsatzes, in der Minderzahl Steigerung nach der Entmilzung. Bei Untersuchung des respiratorischen Stoffwechsels unter Sauerstoffmangel zeigt sich ausnahmslos Erhöhung des Grundumsatzes. Da durch eine passend gewählte Reaktion dasjenige zum Vorschein gekommen war, was in meinen voraufgehenden Versuchen nicht eintraf, hingegen in den Versuchen von *Danoff* und *Streuli* beobachtet wurde, schien es notwendig, vor jeder weiteren Erwägung noch ein anderes Verfahren in Anwendung zu ziehen, um zu

sehen, ob dort sich analoges ereignen würde wie in der voraufgehenden Versuchsreihe. Deshalb habe ich noch eine Anzahl von Versuchen angestellt, in denen ich die Wirkung von Schilddrüsenzufuhr am normalen und am milzlosen Tiere miteinander verglich. Der Gedanke, der mich dabei leitete, war der, daß ich gewissermaßen mit einer anderen Methode etwas Ähnliches herbeiführen könne, wie vorher bei Anstellung der differentiellen Respirationsmethode bei Sauerstoffmangel.

In einer ersten Versuchsreihe habe ich nach Ermittlung des normalen Grundumsatzes die Ratte subkutan mit einem wirksamen Schilddrüsenpräparat injiziert und unter dem Einfluß der Schilddrüsenzufuhr den Grundumsatz ermittelt. Nach Abschluß dieser Versuchsreihe wurde das Tier entmilzt und der Grundumsatz bestimmt. Sodann wurde in der gleichen Weise wie vorher nach Schilddrüsenzufuhr der Grundumsatz ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle IX niedergelegt. Es zeigte sich in diesem Falle am Normaltiere eine verhältnismäßig sehr geringe Steigerung des Grundumsatzes durch die Schilddrüsenzufuhr, nämlich 2,27 Proz. für den Sauerstoffverbrauch und 5,34 Proz. für die Kohlensäurebildung. Nach der Entmilzung sank wie in meinen früheren Versuchen der Grundumsatz unter den Wert des normalen Umsatzes. Unter dem Einfluß der Schilddrüsenpräparatinjektion hob sich der Grundumsatz wieder, und zwar der Sauerstoffverbrauch um 7,2 Proz., die Kohlensäureausscheidung um 8,7 Proz. Das Ergebnis dieses Versuches ist ein positives, indem tatsächlich das milzlose Tier stärker auf Schilddrüsenzufuhr reagiert. Aber diese Reaktion war klein. Deshalb wurden die Versuche fortgesetzt.

In der nächsten Versuchsreihe, deren Ergebnisse Tabelle X zeigt, bediente ich mich des *Oswald*schen Thyrakrins, eines Präparates, welches eine zuverlässige Stoffwechselwirkung besitzt und welches sich sehr gut für intraperitoneale Injektion eignet, ein Verfahren, welches in letzter Zeit vielfach im physiologischen Institut angewandt wird, weil diese Art der Zufuhr fast derjenigen der intravenösen gleichkommt. Nach Ermittlung des Grundumsatzes habe ich jeden Tag 2 Stunden vor dem Versuche 1 ccm der Thyrakrinlösung injiziert und diese Periode über 5 Tage lang ausgedehnt. Der Sauerstoffverbrauch stieg um 7,3 Proz., die Kohlensäureausscheidung um 6,2 Proz. Sodann wurde das Tier entmilzt. Der Grundumsatz verminderte sich unter denjenigen der Norm. Als ich aber dann die Thyrakrinlösunginjektion anschloß, erhöhte sich durchschnittlich der Sauerstoffverbrauch um 26,85, die Kohlensäureausscheidung um 22,87 Proz. In diesem Versuche tritt sehr deutlich zutage, daß das milzlose Tier unter sonst gleichen Bedingungen sehr viel stärker auf Schilddrüsenpräparat reagiert.

Tabelle VIII.

Differentielle Methode des Respirationsstoffwechsels und des Sauerstoffmangels an der normalen und an der milzlosen Ratte.

Versuchsratte.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Bemerkungen
					Versuch mit normaler Luft vor der Operation.							
B	15. VI.	gewöhnliche Fütterung	3	23	0,73	1,33	1,33	0,726	3,25	3,25	136,62	
A	18. VI.	gewöhnliche Fütterung	3	21	0,26	1,34	1,32	0,737	3,32	3,26	134,68	
A	19. VI.	gewöhnliche Fütterung	4	21	0,42	1,82	1,79	0,739	3,32	3,27	136,87	
						Mittelwert:		0,734	3,30	3,28	132,72	
					Versuch mit O_2-Mangel vor der Operation.							
A	20. VI.	gewöhnliche Fütterung	4	20	0,85	1,87	1,70	0,799	3,18	3,06	139,10	
B	22. VI.	gewöhnliche Fütterung	3	21	0,91	1,52	1,44	0,767	3,80	3,60	133,40	
B	25. VI.	gewöhnliche Fütterung	4	21	0,67	2,09	2,05	0,741	3,64	3,57	134,12	
						Mittelwert:		0,769	3,54	3,44	135,54	
					Versuch mit normaler Luft nach der Entmilzung.							
B	28. VI.	gewöhnliche Fütterung	4	22	0,73	1,40	1,37	0,742	2,77	2,71	126,21	am 3. Tage nach der Operation
A	29. VI.	gewöhnliche Fütterung	3	22	0,73	1,05	1,01	0,755	2,82	2,83	123,99	am 4. Tage nach der Operation
B	30. VI.	gewöhnliche Fütterung	3	22	0,60	1,03	0,98	0,726	2,72	2,48	124,92	am 5. Tage nach der Operation
						Mittelwert:		0,741	2,77	2,67	125,04	
					Versuch mit O_2-Mangel nach der Entmilzung.							
A	2. VII.	gewöhnliche Fütterung	3	23	0,58	1,27	1,12	0,838	3,46	3,05	122,24	am 7. Tage nach der Operation
B	3. VII.	gewöhnliche Fütterung	2,5	25	0,70	0,97	0,85	0,829	3,22	2,82	120,41	am 8. Tage nach der Operation
A	4. VII.	gewöhnliche Fütterung	3	23	0,57	1,15	1,05	0,796	3,10	2,83	123,77	am 9. Tage nach der Operation
						Mittelwert:		0,821	3,26	2,90	122,14	

Bemerkung: Als O_2-Mangel habe ich 300 g Pyrogallollösung (60 Proz. Kalilauge und 10 Proz. Pyrogallol) benutzt.

				Versuchsratte vor der Operation:				4,76	7,27	4,87	—	Vermehrt bei dem Versuch mit O_2-Mangel
				" nach " "				10,79	17,69	9,61	—	
				Kontrollratte vor " "				0,66	5,24	3,87	—	
				" nach " "				4,39	23,09	17,64	—	
					Kontrollratte.							
					Versuch mit normaler Luft.							
B	15. VI.	gewöhnliche Fütterung	4	23	0,85	1,62	1,67	0,750	2,64	2,56	153,16	
B	16. VI.		2,5	21	0,50	1,02	0,96	0,773	2,69	2,54	151,45	
A	18. VI.		3	21	0,61	1,19	1,16	0,745	2,69	2,63	147,28	
						Mittelwert:		0,758	2,67	2,58	150,63	
					Versuch mit O_2-Mangel.							
B	20. VI.	gewöhnliche Fütterung	4	20	0,70	1,88	1,81	0,755	3,02	2,93	155,32	
A	22. VI.		3	21	0,18	1,17	1,09	0,780	2,65	2,47	147,11	
A	25. VI.		4	21	0,90	1,77	1,70	0,756	2,90	2,79	152,40	
						Mittelwert:		0,764	2,86	2,73	151,61	
					Versuch mit O_2-Mangel.							
B	2. VII.	gewöhnliche Fütterung	3	23	0,60	1,26	1,16	0,796	2,75	2,53	152,99	
A	3. VII.		2,5	25	0,36	0,97	0,94	0,734	2,61	2,53	148,91	
B	4. VII.		3	23	0,47	1,23	1,18	0,757	2,96	2,84	145,99	
						Mittelwert:		0,763	2,76	2,63	149,30	
					Versuch mit normaler Luft nach der Entmilzung.							
B	9. VII.	gewöhnliche Fütterung	5	26	1,05	1,56	1,40	0,809	2,12	1,91	146,94	3 Tage nach der Operation
A	10. VII.		5	25	0,66	1,55	1,51	0,748	2,20	2,14	141,20	
A	11. VII.		4	24	0,55	1,23	1,16	0,770	2,19	2,07	140,10	
						Mittelwert:		0,773	2,17	2,04	142,74	
					Versuch mit O_2-Mangel.							
A	12. VII.	gewöhnliche Fütterung	3	23	0,61	1,19	1,10	0,785	2,69	2,49	147,23	
B	13. VII.		2,5	24	0,45	0,91	0,81	0,816	2,62	2,33	138,94	
B	14. VII.		3	24	0,68	1,13	1,00	0,821	2,69	2,38	139,90	
						Mittelwert:		0,807	2,67	2,40	141,34	

Tabelle IX. Versuch mit Schilddrüsenzufuhr an der normalen und an der milzlosen Ratte.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Bemerkungen
					Normaler Versuch vor der Operation.							
A	15. VI.	normal	3	21	0,59	1,45	1,45	0,726	3,31	3,31	145,62	
B	18. VI.	normal	3	21	0,67	1,41	1,38	0,742	3,24	3,12	145,32	
B	19. VI.	normal	3	21	0,96	1,28	1,21	0,768	2,98	2,82	143,07	
						Mittelwert:		0,745	3,18	3,08	144,67	
					Nach Injektion von Schilddrüsenpräparat.							
B	21. VI.	normal	4	21	0,96	1,95	1,87	0,758	3,37	3,23	144,81	
A	22. VI.	normal	3	21	0,43	1,45	1,57	0,769	3,39	3,20	142,55	
B	23. VI.	normal	2	21	0,45	0,90	0,85	0,769	3,29	3,12	136,60	
						Mittelwert:		0,765	3,35	3,15	141,32	
					Normaler Versuch nach der Entmilzung.							
A	28. VI.	normal	3	22	0,57	1,31	1,31	0,726	2,89	2,89	150,74	
B	29. VI.	normal	2,5	23	0,34	1,04	1,00	0,756	2,88	2,70	148,17	
A	30. VI.	normal	3	22	0,57	1,21	1,17	0,751	2,83	2,74	142,25	
						Mittelwert:		0,744	2,87	2,78	147,05	
					Nach Injektion von Schilddrüsenpräparat an der normalen Ratte.							
B	2. VII.	normal	3	22	0,72	1,37	1,62	0,754	3,20	3,00	142,73	
A	3. VII.	normal	4	22	0,69	1,72	1,69	0,736	3,12	3,06	138,01	
B	5. VII.	normal	4	22	0,91	1,61	1,49	0,785	3,05	2,81	132,01	
						Mittelwert:		0,759	3,12	2,98	137,84	
					Vergleichstafel, in Prozenten ausgedrückt.							
						Vor der Operation		0,28	5,34	2,27		Vermehrt nach der Injektion
						Nach der Operation		2,02	9,70	7,20		Vermehrt nach der Injektion

Tabelle X. Versuch an dem mit Schilddrüsenpräparat injizierten normalen und milzlosen Meerschweinchen.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht des Meerschweinchens	Bemerkungen
Normaler Versuch vor der Injektion und Operation.												
B	20. VI.	gewöhnlich	3	22	0,88	1,86	1,83	0,738	2,44	2,37	257,90	
A	21. VI.	gewöhnlich	4	22	1,39	2,40	2,09	0,761	2,35	2,24	255,25	
B	22. VI.	gewöhnlich	4	23	1,39	2,51	2,39	0,757	2,46	2,34	254,90	
B	23. VI.	gewöhnlich	3	23	0,78	1,77	1,68	0,765	2,37	2,27	247,28	
A	25. VI.	gewöhnlich	3	23	0,70	1,78	1,70	0,761	2,42	2,33	243,20	
							Mittelwert:	0,756	2,41	2,31	251,71	
Nach Injektion von Thyrakrinlösung (jeden Tag 2 Stunden vor dem Versuch Injektion von 1 ccm Thyrakrinlösung).												
B	29. VI.	gewöhnlich	3	24	0,87	1,77	1,68	0,765	2,50	2,37	239,38	Intraperitoneal injiziert
A	30. VI.	gewöhnlich	4	23	0,98	2,25	2,21	0,740	2,52	2,47	223,54	Intraperitoneal injiziert
B	2. VII.	gewöhnlich	3	22	0,60	1,66	1,59	0,794	2,52	2,52	219,30	Intraperitoneal injiziert
B	3. VII.	gewöhnlich	3	24	0,75	1,72	1,65	0,763	2,68	2,55	214,87	Intraperitoneal injiziert
							Mittelwert:	0,766	2,56	2,48	224,27	
Vergleich mit Normalversuch, ausgedrückt in Prozenten								+ 1,32	+6,22	+7,36	—	
Bemerkung: 1 ccm meiner Thyrakrinlösung enthält eine Tablette mit Thyrakrin.												
Normaler Versuch nach der Entmilzung.												
B	10. VII.	gewöhnlich	4	28	1,35	1,54	1,40	0,799	1,80	1,62	215,57	am 3. Tage nach der Operation
B	11. VII.	gewöhnlich	4	26	1,05	1,49	1,40	0,773	1,89	1,77	196,73	am 4. Tage nach der Operation
A	12. VII.	gewöhnlich	4	28	0,85	1,55	1,48	0,761	1,95	1,86	198,45	am 6. Tage nach der Operation
							Mittelwert:	0,778	1,88	1,75	203,54	
Nach Injektion von Thyrakrinlösung (jeden Tag 2 Stunden vor dem Versuch Injektion von 1 ccm Thyrakrinlösung).												
B	16. VII.	gewöhnlich	2,5	25	0,40	0,95	0,91	0,758	2,12	2,03	179,17	Intraperitoneal injiziert
A	17. VII.	gewöhnlich	3	24	0,50	1,12	1,06	0,768	2,21	2,09	169,15	Intraperitoneal injiziert
B	18. VII.	gewöhnlich	3	24	0,22	1,32	1,27	0,755	2,61	2,54	168,19	Intraperitoneal injiziert
							Mittelwert:	0,760	2,31	2,22	172,17	
Vergleich mit Thyrakrininjektion am Normaltier in Prozenten								— 2,37	+22,87	+26,85		

Noch deutlicher tritt diese Erscheinung in dem nachfolgenden Versuche hervor, dessen Einzelheiten ich in Tabelle XI mitteile. Nach Feststellung des Grundumsatzes schritt ich zur Thyrakrinlösunginjektion und erzielte eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs von 9,3 und der Kohlensäureausscheidung von 10,1 Proz. Sodann führte ich die Milzexstirpation aus. Wiederum sank der Grundumsatz unter den Wert der Norm. Als er konstant geworden war, begann ich mit der Thyrakrinzufuhr. Diese hatte eine sofortige Erhöhung des Grundumsatzes zur Folge, und er stieg während der ganzen Beobachtungsdauer, die sich auf 15 Tage nach der Entmilzung erstreckte, wo also das Tier viel länger als in manchen anderen Versuchen wohlbehalten lebte. Im Durchschnitt erhöhte sich der Sauerstoffverbrauch um 39,2, die Kohlensäureausscheidung um 35,9 Proz. Diese Versuchsreihe zeigt wiederum sehr deutlich, daß ein milzloses Tier anders auf die Schilddrüsenzufuhr reagiert als ein normales, und zwar in dem Sinne, daß es mit einer stärkeren Erhöhung des Grundumsatzes reagiert.

Der Überblick über diejenigen meiner Versuche, welche mit einer kombinierten Reaktion arbeiteten, zeigt ein durchaus übereinstimmendes Bild, nämlich, daß der Mangel der Milz dazu führt, daß im Vergleich zu den Bedingungen des normalen Tieres der Grundumsatz gesteigert ist. Wir haben also die eigentümliche Tatsache, daß in der Mehrzahl meiner Versuche der bloße Mangel der Milz im Gegensatz zu manchen früheren Erfahrungen, andererseits in Übereinstimmung mit anderen Erfahrungen eine Verminderung des Grundumsatzes zeitigt, daß aber diese Verminderung sofort in Erhöhung umschlägt, sobald eine geeignete Reaktion als Versuchsverfahren benutzt wird. Diese Sachlage regt zu dem Versuche an, den scheinbaren Widerspruch in den Erfahrungen nach bloßer Entmilzung aufzuklären. Stellen wir uns auf den Boden der Auffassung, daß in solchen Fällen, mögen sie auch selten sein, wo eine Erhöhung des Grundumsatzes beobachtet wird, nicht Fehlerquellen vorliegen, so könnte man den erhöhten Grundumsatz durch Wegfall einer Hemmung gegenüber solchen Organen erklären, die an und für sich einen fördernden Einfluß besitzen. In erster Linie wäre an die Schilddrüse zu denken. Wenn eine Hemmung für die Schilddrüse wegfällt, so wird dieselbe einen stärkeren Einfluß ausüben. Dieser Gedankengang hatte seinerzeit *Streuli* geleitet, als er seine Experimente anstellte, deren Ergebnisse durchaus im Einklang mit den soeben entwickelten Vorstellungen standen. Man würde sodann weiter folgern, daß in allen denjenigen Fällen, wo nach Entmilzung keine Steigerung des Grundumsatzes gefunden wird, bestimmte Bedingungen im Organismus obwalten, daß das Überwiegen der Schilddrüse sich nicht geltend machen kann. Dies könnte eintreten, wenn die Schilddrüse von vornherein unterwertig wäre, so daß ihre Leistungs-

Tabelle XI. Versuch an der mit Schilddrüsenpräparat injizierten normalen und milzlosen Ratte.

Nr.	Datum	Fütterung	Dauer des Versuchs	Temperatur	H_2O-Bildung	CO_2-Bildung	O_2-Verbrauch	Respirationsquotient	CO_2 pro kg und pro Stunde	O_2 pro kg und pro Stunde	Gewicht der Ratte	Bemerkungen
					Normaler Versuch vor Injektion und Entmilzung.							
B	15. VI.	gewöhnlich	4	21	0,85	1,62	1,57	0,750	2,64	2,56	153,16	
B	16. VI.	gewöhnlich	2,5	22	0,50	1,02	0,96	0,778	2,69	2,54	151,45	
B	13. VI.	gewöhnlich	3	21	0,61	1,19	1,16	0,745	2,69	2,63	147,28	
							Mittelwert:	0,758	2,67	2,58	150,63	
					Nach Injektion von Thyrakrinlösung an der normalen Ratte.							
B	28. VI.	gewöhnlich	3	22	0,71	1,30	1,24	0,762	2,92	2,78	148,32	Jeden Tag 2 Stunden vor dem Versuch 1 ccm Thyrakrinlösung intraperitoneal injiziert
A	29. VI.	gewöhnlich	4	21	0,55	1,80	1,78	0,734	3,01	2,99	149,60	
A	30. VI.	gewöhnlich	2,5	23	0,59	0,96	0,90	0,775	2,88	2,70	133,31	
							Mittelwert:	0,757	2,94	2,82	143,74	
Vergleich mit dem normalen Versuch, ausgedrückt in Prozenten:								-0,13	+10,11	+9,30	—	
Bemerkung: 1 ccm meiner Thyrakrinlösung enthält eine Tablette Thyrakrin.												
					Normaler Versuch nach der Entmilzung.							
A	9. VII.	gewöhnlich	5	26	1,05	1,56	1,40	0,809	2,12	1,91	146,94	am 3. Tage nach der Operation
B	10. VII.	gewöhnlich	5	25	0,66	1,55	1,51	0,748	2,20	2,14	141,20	am 4. Tage nach der Operation
A	11. VII.	gewöhnlich	4	24	0,55	1,23	1,16	0,770	2,19	2,07	140,10	am 5. Tage nach der Operation
							Mittelwert:	0,773	2,17	2,04	142,74	
					Nach Injektion von Thyrakrinlösung an der milzlosen Ratte.							
B	16. VII.	gewöhnlich	3	26	0,54	1,05	1,01	0,755	2,44	2,35	143,21	10 Tage nach der Operation 1 ccm Thyrakrinlösung intraperitoneal injiziert
A	17. VII.	gewöhnlich	3	27	0,85	1,00	0,97	0,749	2,47	2,40	134,62	11 Tage nach der Operation wie gewöhnlich injiziert
B	18. VII.	gewöhnlich	3	25	0,71	1,17	1,12	0,758	2,73	2,61	142,76	am 12. Tage nach der Entmilzung
A	19. VII.	gewöhnlich	4	24	0,95	1,59	1,57	0,758	2,96	2,93	134,10	am 13. Tage nach der Entmilzung
B	20. VII.	gewöhnlich	3	24	0,86	1,40	1,35	0,753	3,30	3,18	141,20	am 14. Tage nach der Entmilzung
B	21. VII.	gewöhnlich	3	24	0,78	1,57	1,49	0,765	3,77	3,59	138,52	am 15. Tage nach der Entmilzung
							Mittelwert:	0,753	2,95	2,84	139,07	
Vergleich mit Thyrakrininjektion am Normaltier, in Prozenten:								-2,66	+35,95	+39,22	—	

fähigkeit durch Wegfall der Milz nicht stiege. Es könnte aber auch das gleiche eintreten, wenn die Schilddrüsenwirkung an und für sich schon das physiologische Maximum im Versuchsindividuum erreicht hätte. Man muß im Auge behalten, daß für viele Hormone die quantitativen Beziehungen gelten, welche besonders *Storm van Lleuwen* genauer entwickelt hat. Die Beziehung zwischen Zunahme an einem Hormon und der Stärke der Wirkung desselben kann kurvenmäßig unter demselben Bilde verlaufen wie etwa die Sättigungskurve eines Eisenstückes in bezug auf Magnetismus. Ist die Sättigung erreicht, so hilft kein weiterer Zuwachs. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, daß die Anspruchsfähigkeit der Organe auf das Schilddrüsensekret herabgesetzt ist. Diese spezielle Möglichkeit habe ich in meinen Versuchen ausschließen können, denn ich konnte zeigen, daß auch in solchen Fällen, wo die bloße Entmilzung Herabsetzung des Stoffwechsels herbeigeführt hatte, die nachherige Zufuhr von Schilddrüsenpräparat eine viel größere Steigerung bewirkte als beim Normaltiere. Die Verwickelungen, an welche man zu denken hat, sind aber noch größer. Durch die Untersuchungen des Berner physiologischen Instituts ist gezeigt worden, daß eine Wechselwirkung zwischen Milz und Leber in dem Sinne besteht, daß die Milz ein aktivierendes Prinzip für gewisse Lebertätigkeiten besitzt. Dementsprechend verursacht Wegfall der Milz eine Minderung der Tätigkeit der Leber. Ist diese Tätigkeit aber herabgesetzt, so kann sich dies in einer Minderung des Grundumsatzes kundtun. Überwiegt dieser Faktor, so wird es möglich sein, daß die Wegnahme der Milz bloß eine Verminderung des Grundumsatzes oder auch auf dem Wege der Konpensation gar keine Veränderung zeigt. Mit Hilfe dieser Darlegung wollte ich nur zeigen, daß nicht wegen Mangels an Tatsachen, sondern im Gegenteil auf Grund einer ganzen Reihe von experimentellen Erfahrungen die Verhältnisse hinsichtlich des Anteils der Milz am Stoffwechsel so verwickelt liegen, daß es noch mancher Arbeit bedürfen wird, um eine endgültige Klärung herbeizuführen. Meine Arbeit liefert insofern einen Beitrag hierzu, als gewisse ihrer Ergebnisse recht positiver Natur sind: In erster Linie die Steigerung der Stickstoffausscheidung in einer großen Anzahl von Fällen nach der Entmilzung. Zweitens die erhöhte Sauerstoffempfindlichkeit der milzlosen Tiere im differentiellen Grundumsatzversuch. Drittens die größere Anspruchsfähigkeit der entmilzten Tiere gegenüber den normalen auf Schilddrüsenzufuhr. Alle diese Erscheinungen könnten nicht eintreten, wenn nicht die Milz einen ganz bestimmten Einfluß auf die Stoffwechselvorgänge des Organismus hätte. Meine Befunde sind neue Beweise in dieser Richtung.

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse meiner Untersuchung die nachfolgenden:

1. Erneute Untersuchungen des respiratorischen Grundumsatzes der Ratte zeigten, daß Entmilzung in der Mehrzahl der Fälle eine Verminderung des Grundumsatzes zur Folge hat; nur einmal konnte der *Danoff*sche Befund der Erhöhung des Grundumsatzes wieder gefunden werden.

2. Ob die Nahrung Eisen enthielt oder eisenarm war, hatte keinen merklichen Einfluß.

3. In der Mehrzahl der Fälle war die Stickstoffausscheidung milzloser Ratten vergrößert.

4. Es wurde ein differentielles Verfahren der Untersuchung des Grundumsatzes bei Sauerstoffmangel ausgearbeitet und hierbei gefunden, daß milzlose Ratten eine größere Anspruchsfähigkeit auf Sauerstoffmangel zeigen als normale, daß sie gewissermaßen in bezug auf ihre Schilddrüsenfunktion überwertig geworden sind.

5. Milzlose Ratten reagieren auf Schilddrüsenzufuhr stärker als Normalratten.

6. Die unter 4. und 5. genannten Tatsachen sprechen zugunsten der Auffassung der *Asher*schen Schule, daß Milz und Schilddrüse in einer gewissen gegensätzlichen Beziehung zueinander stehen.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 61.

Vergleich des Sauerstoffverbrauchs überlebender Säugetierorgane im normalen Zustande und nach Fütterung mit Schilddrüsenhormon.

Von

A. Rohrer.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Nachdem schon seit längerer Zeit bekannt war, daß die Verfütterung von Schilddrüsenhormon den respiratorischen Stoffwechsel des Gesamtorganismus erhöhe, war es von Interesse, zu erfahren, ob sich eine solche Erhöhung auch für die einzelnen Organe nachweisen lasse und, falls dies zutreffen würde, zu sehen, wie sich die einzelnen Organe an dieser Erhöhung beteiligen, welche Organe mehr, welche weniger Sauerstoff absorbieren würden. Diese Aufgabe führte ich auf Anregung und unter Leitung von Prof. *Asher* für Leber, Niere und Muskel aus und gelangte zu den in der Folge angegebenen Resultaten.

Der Apparat, den ich zu meinen Untersuchungen benutzte, ist ein von *Krogh* angegebenes Mikrorespirometer, das er zur Prüfung des respiratorischen Stoffwechsels von kleinen Tieren, wie Raupen, benutzte, und dessen Brauchbarkeit zur Untersuchung von überlebenden Säugetierorganen durch eine nicht veröffentlichte Arbeit von *Knechtli* aus dem Berner Institut erwiesen wurde.

Der Apparat besteht aus einer zweischenkligen Manometerröhre mit einer Millimeterskala. Am oberen Ende der Schenkel sind Kautschukschläuche angebracht, die durch einen Schraubenquetschhahn *H* geschlossen werden können. Jeder Schenkel ist nach hinten mit einer Zweigröhre versehen, durch die er mittels Schlauchverbindung mit je einem Glasbehälter *A* und *C* in Verbindung steht.

Für den Versuch kommen in jeden Behälter 2 ccm Natronlauge, das übrige Volumen wird mit Sauerstoff gefüllt. In einen der Behälter *A* kommt überdies noch das auf seine Sauerstoffabsorption zu prüfende Organ. Dann werden beide Behälter bei noch offenem Quetschhahn *H* in ein Wasserbad gebracht, damit Temperaturgleichheit erreicht wird. Schon während dieser Vorperiode sowie während der ganzen Versuchsdauer muß das Bad sorgfältig durchmischt werden, damit diese Temperaturgleichheit für den ganzen Versuch bestehen bleibt, denn ein kleiner Temperaturunterschied in beiden Behältern würde große Fehler ergeben.

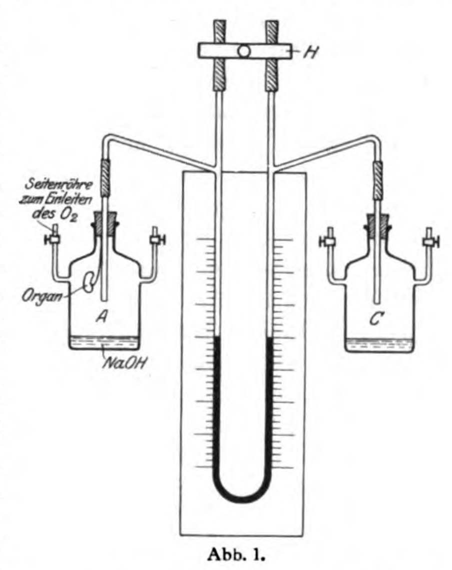


Abb. 1.

Nach etwa 15 Minuten ist der gewünschte Temperaturausgleich erfolgt und der Quetschhahn *H* wird zugedreht. Es ist dann das System Behälter *A*, Manometerröhre, Behälter *C* in sich geschlossen. Das Organ im Behälter *A* wird nun Sauerstoff absorbieren, dadurch wird der Druck daselbst sinken, was sich durch ein Steigen der Manometerflüssigkeit in dem *A* zugehörigen Schenkel und durch ein Sinken in dem *C* angehörenden manifestiert.

Man liest nun zu bestimmten Zeiten den Stand ab. Jede Ablesung gibt, mit der zugehörigen Zeit dividiert, eine Bestimmung der Sauerstoffabsorption.

Aus dieser Druckabnahme im Behälter *A*, abgelesen aus der Niveaudifferenz der Flüssigkeit in beiden Schenkeln wird dann der absorbierte Sauerstoff berechnet nach der Formel:

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right).$$

Dabei ist:

A Das vom Sauerstoff eingenommene Volumen des Organbehälters und des zugehörigen Schenkels. Für den gebrauchten Apparat 29,5 ccm.

C Das vom Sauerstoff eingenommene Volumen des Kontrollbehälters und des zugehörigen Schenkels. Hier 37,6 ccm.

d Die Niveaudifferenz in beiden Schenkeln in Millimetern ausgedrückt.

p Der Druck von 1 mm Manometerflüssigkeit. Für Petroleum, das hier gebraucht wurde, 0,000074 Atm.

Tw Die Temperatur des Wasserbades.

v Das Volumen von 1 mm der Manometerröhre, hier 0,643.

Für einen anderen Apparat, den ich nur für zwei Versuche benutzte, ist:

$A = 32{,}22$ ccm
$C = 30{,}4$ ccm
$v = 0{,}429$ cmm

Da durch die vielen Schlauchverbindungen und die Gummistopfen, mit denen die Behälter geschlossen sind, leicht Undichtigkeiten entstehen können, und die kleinste Undichtigkeit selbstverständlich jedes Resultat unbrauchbar macht, so ist es zweckmäßig, vor jedem Versuche den Apparat auf seine Dichtigkeit zu prüfen. Es geschieht dies am besten dadurch, daß man abwechslungsweise im Behälter *A* und *C* einen Überdruck anbringt und sieht, ob dieser während einiger Zeit unverändert beibehalten wird.

Es bleibt mir noch etwas über die Behandlung der Versuchstiere zu sagen. Als solche dienten mir weiße Mäuse, von denen ein Teil mit gewöhnlicher, ein anderer mit durch Schilddrüsenpräparate gemischter Nahrung gefüttert wurde. Als Schilddrüsenpräparat benutzte ich Tabletten von 0,342 g wirksamer Substanz. Diese wurden mit einem Backwerk im Mörser zerrieben, angefeuchtet und zu Pillen geformt. In je 16 Pillen war eine Tablette enthalten, und eine Maus erhielt täglich sechs Pillen als Futter, so daß sie also täglich ungefähr 0,1 g wirksamer Substanz erhielt.

Um sicher zu sein, daß eine zum Versuche benutzte Maus diese mit Schilddrüse gemischte Nahrung genommen hatte, wurde jede in einem Einzelkäfig während 6—10 Tagen ausschließlich mit diesen Pillen gefüttert.

Der Gang des Versuchs ist kurz folgender: Die Maus wird getötet, das zu untersuchende Organ rasch herausgenommen, gewogen und in dem Organbehälter an einem Haken befestigt. Darauf wird dieser sowie der Kontrollbehälter mit Sauerstoff gefüllt und ins Wasserbad gebracht. Nach 15 Minuten wird der Quetschhahn geschlossen und in kleinen Zeitintervallen die Ablesungen gemacht. Die ersten 10 bis 20 Minuten werden nicht zum Versuche gerechnet, da erst nach dieser Zeit die Sauerstoffabsorption praktisch konstant wird. Der Versuch erstreckt sich auf 60 bis 100 Minuten. Die vielen Zwischenablesungen haben nur den Zweck, zu kontrollieren, ob der Gaswechsel konstant bleibt.

In meiner Arbeit wurden je drei Versuche für Leber, Niere und Muskel beim normalen Tiere und je drei für diese Organe beim mit Schilddrüse gefütterten gemacht. Ich lasse diese Versuche nun folgen, wobei ich den ersten, des besseren Verständnisses willen, etwas ausführlicher durchrechne.

Leber der normalen Maus (1. Versuch). Gewicht 85 mg. *Tw* 19°.

Zeit	Stand der Manometerflüssigkeit in dem *A* angehörenden Schenkel	Stand der Manometerflüssigkeit in dem *C* angehörenden Schenkel	Zeit	Stand der Manometerflüssigkeit in dem *A* angehörenden Schenkel	Stand der Manometerflüssigkeit in dem *C* angehörenden Schenkel
7h12'	137,0	134,0	7h40'	143,0	128,0
7 15	138,0	133,0	7 50	144,5	126,5
7 20	139,0	132,0	8 10	148,0	123,0
7 25	140,0	131,0	8 40	152,5	118,5
7 30	141,0	130,0			

Als Versuchsdauer diene die Zeit von $7^h 20'$ bis $8^h 40' = 80$ Minuten. Dafür ist $d = 27$ mm.

Das Volumen des verbrauchten Sauerstoffs berechnet sich nun nach der Formel

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right), \quad A = 29{,}5 - 0{,}085 = 29{,}415,$$

$$Ap = 29{,}415 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,176\,71 \,.\, 1000 = 2{,}176\,71.$$

Mit 1000 wird multipliziert, um das Volumen A vom Kubikzentimeter in Kubikmillimeter zu verwandeln.

$$\frac{273}{273 + Tw} = \frac{273}{292} = 0{,}935, \quad Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = 0{,}935 \cdot 2{,}1767 = 2{,}635\,214\,5,$$

$$\frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}015}{75{,}2} = 0{,}891, \quad \frac{A + C}{2} \cdot v = 0{,}89 \,.\, 0{,}643 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}0352 + 0{,}5722 = 2{,}6074.$$

Bevor ich d in die Rechnung bringe, will ich seine Größe bestimmen für die Annahme, daß der Versuch eine Stunde gedauert hätte und das Organgewicht 1 g wäre.

$$d = 27 \text{ mm für } 80 \text{ Minuten und } 85 \text{ mg}.$$

Für 60 Minuten und 85 mg ist $d = \frac{27 \,.\, 60}{80} = 20{,}22.$

Für 60 Minuten und 1000 mg ist $d = \frac{20{,}22 \,.\, 1000}{85} = 237{,}8.$

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 237{,}8 \,.\, 2{,}6074 = \mathbf{620} \textbf{ cmm}.$$

1 g Leber der normalen Maus absorbiert also pro Stunde **620 cmm** O_2.

Leber der normalen Maus (2. Versuch).
Gewicht 102 mg. $Tw = 20^0$.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
$3^h 40'$	143,5	128,0	$4^h 40'$	158,0	113,0
3 50	146,5	125,0	5 00	162,0	109,0
4 00	149,0	122,0	5 20	166,0	105,0
4 20	153,0	118,0			

$$A = 29{,}5 - 0{,}102 = 29{,}398,$$

$$Ap = 29{,}398 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,175\,452 \,.\, 1000 = 2{,}1754,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{293} = 2{,}026\,820\,18, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{66{,}998}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}026\,82 \,.\, 0{,}572\,27 = 2{,}599\,09.$$

Von 4^h bis $5^h 20' = 80$ Minuten. Dafür ist $d = 34$ mm.

Für 1 g und 1 Stunde ist $d = 247$ mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 247 \,.\, 2{,}599 = \mathbf{642} \textbf{ cmm}.$$

1 g Leber der normalen Maus absorbiert pro Stunde **642 cmm** O_2.

Leber der normalen Maus (3. Versuch).
Gewicht 123 mg. Tw 21°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
9h22'	131,5	125,5	9h52'	139,5	117,5
9 27	133,0	124,0	10 02	142,0	115,0
9 37	135,8	121,2	10 12	144,5	112,5
9 42	137,0	120,0	10 32	149,5	107,5

$$A = 32,22 - 0,123 = 32,097,$$
$$Ap = 32,097 . 0,000\,074 = 0,002\,375\,178 . 1000 = 2,375,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap\,\frac{273}{294} = 2,204, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{62,497}{60,8} = 1,027,$$
$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0,429 . 1,027 = 0,440\,583,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2,204 + 0,4405 = 2,6445.$$

Von 9h27' bis 10h32' = 65 Minuten. Dafür ist d = 33 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 247,6 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 247,6 . 2,6445 = \mathbf{654\ cmm}.$$

1 g Leber der normalen Maus absorbiert also pro Stunde 654 cmm O_2.

Leber der Maus nach Schilddrüsenfütterung (1. Versuch).
Gewicht 96 mg. Tw 17°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
4h38'	139,0	132,5	5h30'	152,0	119,5
4 45	141,0	130,5	5 43	155,0	116,5
4 50	142,0	129,5	5 57	158,0	113,5
4 57	144,0	127,5	6 06	160,0	111,5
5 09	147,0	124,5	6 11	161,0	110,5
5 17	149,0	122,5			

$$A = 29,5 - 0,096 = 29,404,$$
$$Ap = 29,404 . 0,000\,074 = 0,002\,175\,8 . 1000 = 2,1758,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} \quad Ap \cdot \frac{273}{290} = 2,047\,4278, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67,004}{75,2} = 0,89,$$
$$v \cdot \frac{A + C}{2C} \quad 0,643 . 0,89 = 0,572\,27,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2,0474 + 0,5722 = 2,6196.$$

Von 4h50' bis 6h11' = 81 Minuten. Dafür ist d = 38 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 293,2 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 293,2 . 2,6196 = \mathbf{768\ cmm}.$$

1 g Leber der mit Schilddrüse gefütterten **Maus absorbiert also** pro Stunde **768 cmm** O_2.

Leber der Maus nach Schilddrüsenfütterung (2. Versuch).
Gewicht 94 mg. *Tw* 19°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
10h40′	140,0	131,5	11h16′	150,0	121,5
10 48	143,0	129,0	11 26	152,5	119,0
10 56	145,0	126,0	11 41	156,0	116,0
11 06	147,5	124,0	12 00	160,0	112,0

$$A = 29{,}5 - 0{,}094 = 29{,}406,$$

$$Ap = 29{,}406 \cdot 0{,}000\,074 = 0{,}002\,176\,044 \,.\, 1000 = 2{,}176\,04,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{292} = 2{,}034\,342\,4, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}006}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}034\,34 + 0{,}572\,27 = 2{,}606\,61.$$

Von 10h 48′ bis 12h = 72 Minuten. Dafür ist $d = 34$ mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist $d = 301$ mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 301 \,.\, 2{,}6066 = 784 \text{ cmm}.$$

1 g Leber der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert also pro Stunde **784 cmm** O_2.

Leber der Maus nach Schilddrüsenfütterung (3. Versuch).
Gewicht 119 mg. *Tw* 21°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
2h27′	133,0	124,5	2h57′	143,5	114,0
2 32	134,5	122,5	3 07	146,5	111,0
2 37	137,0	120,5	3 27	152,0	105,5
2 47	140,0	117,5	3 47	158,0	99,5

$$A = 32{,}22 - 0{,}119 = 32{,}101,$$

$$Ap = 32{,}101 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,375\,474 \,.\, 1000 = 2{,}375,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{294} = 2{,}204, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{62{,}501}{60{,}8} = 1{,}029,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}429 \,.\, 1{,}029 = 0{,}441\,44,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}204 + 0{,}441\,44 = 2{,}645.$$

Von 2h 37′ bis 3h 47′ = 70 Minuten. Dafür ist $d = 42$ mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist $d = 302{,}5$ mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 302{,}5 \,.\, 2{,}645 = 800 \text{ cmm}.$$

1 g Leber der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert also pro Stunde **800 cmm** O_2.

Faßt man nun die für die Leber gefundenen Resultate zusammen, so hat man bei der normalen Maus eine Sauerstoffabsorption von:

1. 620 cmm pro Gramm und pro Stunde,
2. 642 ,, ,, ,, ,, ,, ,,
3. 654 ,, ,, ,, ,, ,, ,,

oder im Mittel **639 cmm.**

Bei der mit Schilddrüse gefütterten Maus:

1. 786 cmm pro Gramm und pro Stunde,
2. 784 ,, ,, ,, ,, ,, ,,
3. 800 ,, ,, ,, ,, ,, ,,

oder im Mittel **784 cmm.**

Für 1 g Leber findet man also pro Stunde eine Vermehrung der Sauerstoffabsorption von **145 cmm** bei der mit Schilddrüse gefütterten Maus gegenüber der normalen.

Niere der normalen Maus (1. Versuch).
Gewicht 88 mg. *Tw* 21°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
3h55′	137,0	134,0	4h30′	147,0	124,5
4 00	139,0	132,0	4 40	149,5	122,0
4 06	141,0	130,0	4 52	152,0	119,5
4 10	142,5	129,0	5 02	154,0	117,5
4 21	145,0	126,0			

$$A = 29{,}5 - 0{,}088 = 29{,}412,$$

$$Ap = 29{,}412 \cdot 0{,}000\,074 = 0{,}002\,176\,488 \cdot 1000 = 2{,}176,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{294} = 2{,}019\,328, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}01}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \, . \, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}019\,328 + 0{,}572\,27 = 2{,}591\,598.$$

Von 4h bis 5h 02′ = 62 Minuten. Dafür ist d = 29,5 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 324 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 324 \, . \, 2{,}5915 = \mathbf{839\ cmm}.$$

1 g Niere der normalen Maus absorbiert also pro Stunde **839 cmm** O_2.

Niere der normalen Maus (2. Versuch).
Gewicht 92 mg. *Tw* 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
10h35′	137,5	133,5	11h05′	146,5	125,0
10 40	139,0	131,5	11 25	151,0	120,5
10 45	141,0	130,0	11 45	155,5	116,0
10 55	144,0	127,0			

$$A = 29{,}5 - 0{,}092 = 29{,}408,$$

$$Ap = 29{,}408 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,176 \,.\, 1000 = 2{,}176,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{295} = 2{,}0128, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}008}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}0128 + 0{,}572\,27 = 2{,}585\,07.$$

Von 10h45' bis 11h45' = 60 Minuten. Dafür ist $d = 28{,}5$ mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist $d = 309{,}7$ mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 309{,}7 \,.\, 2{,}585 = 800 \text{ cmm } O_2.$$

1 g Niere der normalen Maus absorbiert also pro Stunde **800 cmm O_2**.

Niere der normalen Maus (3. Versuch).
Gewicht 90 mg. Tw 21°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
9h30'	140,0	130,5	10h00'	148,0	122,5
9 35	141,5	129,0	10 10	150,5	120,0
9 40	143,0	127,0	10 30	155,0	115,5
9 50	145,5	125,0	10 50	159,5	111,0

$$A = 29{,}5 - 0{,}09 = 29{,}41,$$

$$Ap = 29{,}41 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,176\,34 \cdot 1000 = 2{,}176\,34,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{294} = 2{,}019\,328, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}01}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}019\,328 + 0{,}572\,27 = 2{,}591\,598.$$

Von 9h 40' bis 10h 50' = 70 Minuten. Dafür ist $d = 33$ mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist $d = 314{,}2$ mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 314{,}2 \,.\, 2{,}591\,59 = 814 \text{ cmm}.$$

1 g Niere der normalen Maus absorbiert also pro Stunde **814 cmm O_2**.

Niere der Maus nach Schilddrüsenfütterung (1. Versuch).
Gewicht 112 mg. Tw 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
6h30'	137,5	133,0	7h00'	149,5	121,5
6 35	140,0	131,0	7 10	153,0	118,0
6 40	142,0	129,0	7 20	156,0	115,0
6 50	146,0	125,0	7 40	162,5	108,5

$$A = 29{,}5 - 0{,}112 = 29{,}388,$$

$$Ap = 29{,}388 \cdot 0{,}000\,074 = 0{,}002\,174\,712 \,.\, 1000 = 2{,}174,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{295} = 2{,}010\,95, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{66{,}988}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}010\,95 + 0{,}572\,27 = 2{,}583\,22.$$

Von 6h 35′ bis 7h 40′ = 65 Minuten. Dafür ist d = 45 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 370,3 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 370{,}3 \,.\, 2{,}5832 = \mathbf{956\ cmm\ O_2}.$$

1 g Niere der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert also pro Stunde **956 cmm O_2**.

Niere der Maus nach Schilddrüsenfütterung (2. Versuch).
Gewicht 101 mg. Tw 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
4h05′	144,0	127,5	4h55′	160,5	111,0
4 15	148,0	123,5	5 15	166,5	105,0
4 25	151,0	120,5	5 35	172,0	99,5
4 35	154,0	117,5			

$$A = 29{,}5 - 0{,}101 = 29{,}399,$$

$$Ap = 29{,}399 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,175\,5 \,.\, 1000 = 2{,}1755,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{295} = 2{,}012\,337\,5, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{66{,}999}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}012\,33 + 0{,}572\,27 = 2{,}5846.$$

Von 4h 15′ bis 5h 35′ = 80 Minuten. Dafür ist d = 48 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 356,4 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 356{,}4 \cdot 2{,}5846 = \mathbf{921\ cmm\ O_2}.$$

1 g Niere der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert also pro Stunde **921 cmm O_2**.

Niere der Maus nach Schilddrüsenfütterung (3. Versuch).
Gewicht 92 mg. Tw 21°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
2h20′	136,5	134,5	2h55′	147,0	124,5
2 25	138,5	133,0	3 05	150,0	121,5
2 30	140,0	131,5	3 25	155,5	116,0
2 35	141,5	130,0	3 45	161,0	110,5
2 45	144,5	127,0			

$$A = 29{,}5 - 0{,}092 = 29{,}408,$$

$$Ap = 29{,}408 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,176 \,.\, 1000 = 2{,}176,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{294} = 2{,}019\,328, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}008}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + \cdot v \frac{A + C}{2C} = 2{,}019\,328 + 0{,}572\,27 = 2{,}591\,598.$$

Von 2h 30′ bis 3h 45′ = 75 Minuten. Dafür ist $d = 42$ mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist $d = 365$ mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 365 \,.\, 2{,}5915 = 945 \text{ cmm } O_2.$$

1 g Niere der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert also pro Stunde **945 cmm** O_2.

Für die Sauerstoffabsorption der Niere ergeben sich demnach folgende Resultate:

Bei der normalen Maus:

1. 839 cmm pro Gramm und pro Stunde,
2. 800 ,, ,, ,, ,, ,, ,,
3. 814 ,, ,, ,, ,, ,, ,,

oder im Mittel **818 cmm.**

Bei der mit Schilddrüse gefütterten Maus:

1. 956 cmm pro Gramm und pro Stunde,
2. 921 ,, ,, ,, ,, ,, ,,
3. 945 ,, ,, ,, ,, ,, ,,

oder im Mittel **941 cmm.**

Für 1 g Niere findet man also pro Stunde eine Vermehrung der Sauerstoffabsorption von **123 cmm** bei der mit Schilddrüse gefütterten Maus gegenüber der normalen.

Muskel der normalen Maus (1. Versuch).
Gewicht 33 mg. *Tw* 21°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
2h 45′	139,2	132,0	3h 25′	144,0	127,5
2 55	141,0	130,2	3 45	145,5	126,0
3 05	142,0	129,5	4 05	147,0	124,5

$$A = 29{,}5 - 0{,}033 = 29{,}467,$$

$$Ap = 29{,}467 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,180\,55 \,.\, 1000 = 2{,}180\,55,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{294} = 2{,}023\,304, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}067}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}023\,304 + 0{,}572\,27 = 2{,}595\,574.$$

Von $3^h 05'$ bis $4^h 05'$ = 60 Minuten. Dafür ist d = 10 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 303 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + \frac{A+C}{2C}\right) = 303 \,.\, 2{,}5955 = 786 \text{ cmm } O_2.$$

1 g Muskel der normalen Maus absorbiert also pro Stunde **786 cmm O_2**.

Muskel der normalen Maus (2. Versuch).
Gewicht 25 mg. Tw 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
$10^h 50'$	139,2	131,8	$11^h 40'$	143,0	128,0
11 00	140,0	131,0	12 00	144,0	127,0
11 20	141,5	129,5	12 20	145,0	126,0

$$A = 29{,}5 - 0{,}025 = 29{,}475,$$
$$Ap = 29{,}475 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,181\,15 \,.\, 1000 = 2{,}18115,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{295} = 2{,}017\,563\,75, \quad \frac{A+C}{2C} = \frac{67{,}075}{75{,}2} = 0{,}89,$$
$$v \cdot \frac{A+C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A+C}{2C} = 2{,}017\,563 + 0{,}572\,27 = 2{,}589\,833.$$

Von 11^h bis $12^h 20'$ = 80 Minuten. Dafür ist d = 10 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 300 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A+C}{2C}\right) = 300 \,.\, 2{,}589\,833 - 777 \text{ cmm } O_2.$$

1 g Muskel der normalen Maus absorbiert also pro Stunde **777 cmm O_2**.

Muskel der normalen Maus (3. Versuch).
Gewicht 32 mg. Tw 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
$10^h 47'$	129,0	128,0	$11^h 17'$	132,0	125,0
10 57	130,0	127,0	11 37	133,5	123,5
11 07	131,0	126,0	11 57	135,0	122,0

$$A = 29{,}5 - 0{,}032 = 29{,}468,$$
$$Ap = 29{,}468 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,180\,6 \,.\, 1000 = 2{,}1806,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{295} = 2{,}170\,55, \quad \frac{A+C}{2C} = \frac{67{,}069}{75{,}2} = 0{,}89,$$
$$v \cdot \frac{A+C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A+C}{2C} = 2{,}017\,055 + 0{,}572\,27 = 2{,}589\,325.$$

Von $10^h 57'$ bis $11^h 57'$ = 60 Minuten. Dafür ist d = 10 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 312,5 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A+C}{2C}\right) = 312{,}5 \,.\, 2{,}5893 = 809 \text{ cmm } O_2.$$

1 g Muskel der normalen Maus absorbiert also pro Stunde **809 cmm O_2**.

Muskel der Maus nach Schilddrüsenfütterung (1. Versuch).
Gewicht 30 mg. *Tw* 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
6h 40′	137,5	134,0	7h 20′	142,0	129,5
6 50	139,0	133,0	7 40	144,0	128,0
7 00	140,0	131,5	8 00	145,5	126,0

$$A = 29{,}5 - 0{,}03 = 29{,}47,$$
$$Ap = 29{,}47 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,180\,78 \,.\, 1000 = 2{,}180\,78,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \,.\, \frac{273}{295} = 2{,}017\,147\,5, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}07}{75{,}2} = 0{,}89,$$
$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}017\,147 + 0{,}572\,27 = 2{,}589\,417.$$

Von 7h bis 8h = 60 Minuten. Dafür ist d = 11 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 366 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 366 \cdot 2{,}589\,417 = \mathbf{947\ cmm\ O_2}.$$

1 g Muskel der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert also pro Stunde **947 cmm** O_2.

Muskel der Maus nach Schilddrüsenfütterung (2. Versuch).
Gewicht 23 mg. *Tw* 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
3h 10′	132,0	124,5	3h 50′	134,5	122,0
3 20	132,5	124,0	4 10	136,5	120,0
3 30	133,0	123,5	4 30	138,0	119,0

$$A = 29{,}5 - 0{,}023 = 29{,}477,$$
$$Ap = 29{,}477 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,181\,29 \,.\, 1000 = 2{,}181\,29,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{295} = 2{,}017\,702\,5, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}077}{75{,}2} = 0{,}89,$$
$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}89 = 0{,}572\,27,$$
$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}017\,702 + 0{,}572\,27 = 2{,}589\,972.$$

Von 3h 20′ bis 4h 30′ = 70 Minuten. Dafür ist d = 10,5 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 391 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 391 \,.\, 2{,}5899 = \mathbf{1012\ cmm\ O_2}.$$

1 g Muskel der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert also pro Stunde **1012 cmm** O_2.

Muskel der Maus nach Schilddrüsenfütterung (3. Versuch).
Gewicht 12 mg. *Tw* 22°.

Zeit	A	C	Zeit	A	C
6h 45'	133,0	124,0	7h 40'	135,0	121,5
6 55	133,5	123,5	8 00	136,0	121,0
7 20	135,0	122,0			

$$A = 29{,}5 - 0{,}012 = 29{,}488,$$

$$Ap = 29{,}488 \,.\, 0{,}000\,074 = 0{,}002\,182\,11 \,.\, 1000 = 2{,}182\,11,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} = Ap \cdot \frac{273}{295} = 2{,}018\,442\,5, \quad \frac{A + C}{2C} = \frac{67{,}088}{75{,}2} = 0{,}89,$$

$$v \cdot \frac{A + C}{2C} = 0{,}643 \,.\, 0{,}892 = 0{,}573\,556,$$

$$Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C} = 2{,}018\,44 + 0{,}573\,55 = 2{,}591\,99.$$

Von 6h 55' bis 8h = 65 Minuten. Dafür ist d = 5 mm.
Für 1 g und 1 Stunde ist d = 384,5 mm.

$$d\left(Ap \cdot \frac{273}{273 + Tw} + v \cdot \frac{A + C}{2C}\right) = 384{,}5 \,.\, 2{,}591\,99 = 996 \text{ cmm } O_2.$$

1 g Muskel der Maus nach Schilddrüsenfütterung absorbiert pro Stunde **996 cmm** O_2.

Für die Sauerstoffabsorption des Muskels ergeben sich demnach folgende Werte:

Bei der normalen Maus:

1. 786 cmm pro Gramm und pro Stunde,
2. 777 ,, ,, ,, ,, ,, ,,
3. 809 ,, ,, ,, ,, ,, ,,

oder im Mittel **791 cmm.**

Bei der mit Schilddrüse gefütterten Maus:

1. 947 cmm pro Gramm und pro Stunde,
2. 1012 ,, ,, ,, ,, ,, ,,
3. 996 ,, ,, ,, ,, ,, ,,

oder im Mittel **985 cmm.**

Für 1 g Muskel findet man also pro Stunde eine Vermehrung der Sauerstoffabsorption von 194 cmm bei der mit Schilddrüse gefütterten Maus gegenüber der normalen.

Stellen wir nun die gefundenen Mittelwerte zur Übersicht zusammen, so haben wir:

Bei der normalen Maus für 1 g Leber pro Stunde eine Sauerstoffabsorption von **639 cmm.**

Bei der mit Schilddrüse gefütterten **784 cmm.**

Also bei der letzteren ein Mehr von **145 cmm** oder **22,6 Proz.**

Bei der normalen Maus für 1 g Niere pro Stunde eine Sauerstoffabsorption von **818 cmm.**

Bei der mit Schilddrüsen gefütterten **941 cmm.**

Also bei letzterer ein Mehr von **123 cmm** oder **15,6 Proz.**

Bei der normalen Maus für 1 g Muskel pro Stunde eine Sauerstoffabsorption von **791 cmm.**

Bei der mit Schilddrüse gefütterten **985 cmm.**

Also bei letzterer ein Mehr von **194 cmm** oder **23,9 Proz.**

Aus dieser Arbeit ergibt sich also, daß nach Verfütterung von Schilddrüsenhormon nicht nur eine Erhöhung des respiratorischen Stoffwechsels des Gesamtorganismus gefunden wird, sondern daß sich auch eine solche Erhöhung für die einzelnen isolierten überlebenden Organe nachweisen läßt, die je nach dem Organ verschieden ist.

Über den Einfluß intravenöser Eiweißinjektionen auf den respiratorischen Grundumsatz.

Von

Emil Amstad.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

Die parenterale, insbesondere die intravenöse Injektion von Eiweiß ist kein indifferenter Eingriff. Die hier eintretenden Wirkungen haben ein großes praktisches Interesse gewonnen, seitdem diese infolge der Immunitätslehre eingeführten Seruminjektionen therapeutisch bedeutungsvoll geworden sind. Auch die in der letzten Zeit viel diskutierte Proteinkörpertherapie trägt zum Interesse an der Lösung des hier gestellten Problems ihren Anteil bei.

Die Physiologie hat aber, unabhängig von allen diesen therapeutischen Bestrebungen, schon lange vor dieser Zeit Erfahrungen über die Wirkung intravenöser Eiweißzufuhr im tierischen Körper gesammelt. Einen mächtigen Anstoß erhielten derartige physiologische Forschungen, als *Heidenhain* in seiner berühmten Lympharbeit zeigen konnte, daß intravenöse Injektionen von Eiweiß eine stark lymphtreibende Wirkung besitzen.

Sodann hat *Asher* die Wirkung dieser Art von Lymphagoga aufgeklärt, indem er zeigte, daß diese parenteral eingeführten Stoffe *Lebergifte* seien.

Diese Anschauungen *Ashers* über die Lebergifte haben in der neueren Zeit durch die Untersuchungen von *Junkersdorf* in Bonn von einer ganz anderen Seite her Bestätigung gefunden. Wenn dem so ist, so darf die parenterale Injektion von Serum als ein Mittel betrachtet werden, um in die Leberfunktion einzugreifen. Ausgehend von dieser Erwägung, könnte daran gedacht werden, den Einfluß von intravenösen Eiweißinjektionen auf den respiratorischen Grundumsatz zu untersuchen und in einer allfällig eintretenden Beeinflussung desselben den Ausdruck der geänderten Leberfunktion unter der Einwirkung des parenteral zugeführten Eiweißes zu erblicken. Nun könnte der Einwand erhoben werden, daß, falls die intravenöse Eiweißinjektion eine Veränderung des respiratorischen Grundumsatzes veranlaßt, dies nicht notwendig auf einer geänderten Leberfunktion beruhen müßte, sondern als Folge einer irgendwie anderweitig im Körper verursachten Veränderung des Grundumsatzes aufzufassen wäre. Dieser Einwand ist berechtigt und muß berücksichtigt werden. Immerhin muß vom Standpunkte der Physiologie aus darauf hingewiesen werden, daß bisher die experimentell

etwas genauer zu analysierenden Veränderungen ausschließlich auf die Leber zurückzuführen sind, nicht bloß die gesteigerte Lymphbildung, sondern auch die verminderte Gerinnungsfähigkeit des Blutes.

Unabhängig aber von der Beziehung zur Frage der Leberfunktion hat die Untersuchung des Verhaltens des respiratorischen Grundumsatzes nach parenteralen Eiweißinjektionen an sich ein großes Interesse, denn der Grundumsatz gibt uns wohl mit am schärfsten Auskunft über die physiologischen Zustände im Organismus, da wir mit der Untersuchung des Grundumsatzes uns an der Quelle der vitalen Energielieferung befinden.

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich nun darum, Aufschluß zu erhalten über die Menge, die ein bestimmtes Versuchstier unter bestimmten Bedingungen in der Atmungsluft an CO_2 produziert und an O_2 verbraucht, ausgedrückt in Kubikzentimetern des betreffenden Gases pro Minute und pro Kilogramm Körpergewicht. Das Verhältnis beider Werte $CO_2 : O_2$ ergibt den respiratorischen Quotienten.

Als Versuchstier diente das Kaninchen. Die Untersuchung fand im *Jaquet*schen Respirationsapparat des Berner physiologischen Instituts statt, der in früheren Arbeiten aus diesem Institut beschrieben worden ist. Um Kaninchen für die Methodik der Respirationsversuche hiermit, die sich an Menschen und Hunden mit einer Genauigkeit, welche von anderen Apparaten nicht übertroffen wird, anstellen lassen, geeignet zu machen, wurden die Kaninchen mit einer Diät aus Milch und Brot bestehend ernährt, und sie wurden hierdurch in bezug auf Ablaufsdauer und Art des Stoffwechsels den genannten anderen Lebewesen ähnlich. Die Fütterung mit Milch und Brot geschah schon 14 Tage vor Beginn der Versuche, um die Tiere an diese Ernährungsart zu gewöhnen, und um Schwankungen des Stoffwechsels im Beginn der Versuche vorzubeugen. Vor jedem Einzelversuch hungerte das entsprechende Versuchstier 18 bis 20 Stunden vollständig. Die eigentlichen Versuche begannen erst, nachdem sich das Tier auf konstanten Grundumsatz eingestellt hatte.

Die Gasanalysen wurden mit dem zum Jaquetapparat gehörigen Analysenapparat von *Petterson-Palmquist* ausgeführt. Diesen zog ich dem *Haldane*schen Apparat vor, weil er mit dreimal größeren Gasmengen arbeitend, genauere Analysen erlaubt. Um den Zeitverlust auszugleichen, den die größere Menge mit sich bringt, habe ich mich des zuerst von *Durig* für physiologische Analysen empfohlenen Natriumhydrosulfids als Sauerstoffabsorptionsmittel bedient. Die Lösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

Natriumhydrosulfurosum *Merck*, pro Analyse .	50,0
Kalium hydricum (60 proz.)	40,0
Aqua dest.	250,0

Diese Lösung muß allerdings nach höchstens 10 bis 12 Einzelanalysen erneuert werden.

In neuerer Zeit hat *A. Krogh*[1]) einen Gasanalysenapparat von der hohen Genauigkeit von 0,001 Proz. konstruiert. Einer der wesentlichen

[1]) *A. Krogh*, The Biochemic. Journ. **14**, 267, 1920.

Punkte an diesem neuen Apparate ist, neben der Benutzung von drei getrennten Gasbüretten, die Hebung des Quecksilbers durch Luftdruck, wodurch die Anwendung eines langen Gummischlauches bei der manuellen Hebung und Senkung eines Quecksilberreservoirs vermieden wird. Im Gummischlauch wird aber das Quecksilber verunreinigt, wodurch namentlich die Genauigkeit der Sauerstoffanalyse leidet. Mangels Besitz dieses genauen Apparates hat Professor *Asher* an den Gasanalysenapparaten des Berner Instituts zwischen Gummischlauch und Gasbürette eine zweischenklige Orsatbürette einschalten lassen, so daß nur Quecksilber, welches nicht mit dem Gasschlauch vorher in Berührung war, in die Analysenbürette aufstieg. Diese Hilfseinrichtung hob die Genauigkeit der Analysen, und es dauerte länger, ehe die Analysenbürette einer neuen Reinigung bedurfte.

Die Aufgaben der vorliegenden Arbeit sind die folgenden:

1. Feststellung des Grundumsatzes, der Kohlensäureproduktion und des Sauerstoffverbrauchs des bestimmten Versuchstieres in Kubikzentimetern pro Minute und Kilogramm Körpergewicht, und des respiratorischen Quotienten *unter normalen Bedingungen*, d. h. im Hungerzustande.

2. Feststellung des Grundumsatzes desselben Tieres nach *intravenöser Injektion* von *Ringerlösung*.

3. Feststellung des Grundumsatzes desselben Tieres nach *intravenöser Injektion* von *artfremdem Eiweiß* in verschiedenen Quantitäten (Pferdeserum).

4. Feststellung des Grundumsatzes desselben Tieres nach *intravenöser Injektion* von *arteigenem Eiweiß* (Kaninchenserum).

Wir kommen nun zu den Normalversuchen des Grundumsatzes und deren Resultate. Die Versuche dauerten 2 bis 6 Stunden und wurden an verschiedenen (drei) Tieren gemacht. Gewicht der Tiere 2200 g, 2300 g und 2420 g. Nach je einer Stunde wurde eine Gasprobe entnommen und analysiert.

Tabelle I.

Normalversuche.

Nr.	Ventilation pro Std.		CO_2-Produktion		O_2-Verbrauch		Respirationsquotient
	Liter		Liter	ccm	Liter	ccm	
1	570 reduz.	483	0,9618	7,0	1,385	10,08	0,694
2	570 „	483	1,0143	7,3	1,35	9,83	0,74
3	784 „	673	1,48	11,2	1,965	14,67	0,74
4	784 „	673	1,414	10,617	1,8844	14,07	0,74
5	584 „	500,3	1,3	9,5	1,85	13,25	0,72
6	584 „	500,3	1,4	10,14	1,9236	14,0	0,73
7	651 „	544,3	1,415	10,2	1,7417	13,9	0,734
8	812 „	679	1,493	10,8	2,042	14,8	0,73
9	522,2 „	445	1,245	8,07	1,323	10,83	0,745
10	444 „	379	1,0612	8,2	1,442	11,11	0,738
Durchschnitt aus Versuch 2 bis 10			pro Std. ccm/kg Min. 9,5585		pro Std. ccm/kg Min. 12,94		0,7374

In dieser Tabelle geben wir in der ersten Kolonne das Luftquantum an, das das Versuchstier zur Respiration zur Verfügung bekommt, als Straßenluft in Litern pro Stunde. Dieser Wert wird nach Maßgabe des Thermobarometers auf die Temperatur der Außenluft reduziert, da die Ausatmungsluft nicht nur in ihrem Gehalt an O_2 und CO_2, sondern auch in der Temperatur verändert ist.

In der zweiten Kolonne ist der Gehalt an CO_2 angegeben, um den die Ausatmungsluft gegenüber der Straßenluft erhöht ist, also die reine CO_2-Produktion, ausgedrückt in Litern pro Stunde.

Die dritte Kolonne zeigt den nämlichen Wert von Kolonne 2 an, umgerechnet auf Kubikzentimeter pro Kilogramm Körpergewicht und pro Minute.

Die vierte Kolonne enthält die Sauerstoffmenge, um die die ventilierte Luft gegenüber der Straßenluft vermindert ist, umgerechnet auf den Stickstoffgehalt der Straßenluft, also den Sauerstoffverbrauch, ausgedrückt in Litern pro Stunde.

Die fünfte Kolonne gibt diesen Wert an, umgerechnet auf Kubikzentimeter pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute.

Die sechste Kolonne ist der Quotient der Werte von Kolonnen 3 und 5, $CO_2 : O_2$, d. h. der *respiratorische Quotient*.

Die uns hauptsächlich interessierenden Werte sind diejenigen von Kolonnen 3, 5 und 6, d. h. die Werte, die uns direkt Aufschluß geben über die Kohlensäureproduktion und den Sauerstoffverbrauch des tierischen Organismus pro Kilogramm Körpergewicht und pro Minute, ausgedrückt in Kubikzentimetern, und den respiratorischen Quotienten.

Für ein Kaninchen vom Gewicht von 2200 bis 2400 g stellt sich als Mittelwert aus einer größeren Versuchsreihe folgender Grundumsatz heraus:

Kohlensäureproduktion . . .	9,5585 ccm/kg/Min.
Sauerstoffverbrauch	12,94 ,,
Respirationsquotient	0,7374 ,,

Als Ausgangswerte wurde der Gehalt der Straßenluft von CO_2 mit 0,03 Proz., an O_2 mit 20,94 Proz. angesetzt, welche Mittelwerte, aus zahlreichen Luftanalysen gewonnen, auch aus meinen Versuchen resultierten, die ich in längeren Versuchsreihen anstellte, um mich für die Hauptversuche in der Gasanalyse einzuüben und um den Apparat auf seine Zuverlässigkeit zu prüfen.

Nachdem wir nun den Grundumsatz der Versuchstiere unter normalen Bedingungen festgestellt haben, wollen wir, bevor wir an die Versuche über die Stoffwechselverhältnisse bei Injektion von artfremdem Eiweiß herantreten, ermitteln, wie sich die Dinge verhalten, wenn wir dem Versuchstiere intravenöse Injektionen der isotonischen Ringerlösung verabfolgen.

Es wurden also in den folgenden Versuchen dem Tiere je 2 ccm Ringerlösung in die eine Ohrvene injiziert und darauf sofort jeweils ein Stoffwechselversuch angeschlossen.

In der zweiten Tabelle teilen wir die dabei erzielten Resultate mit.

Tabelle II. Injektion von 2 ccm Ringerlösung.

Ventilation Liter pro Std.	CO_2-Produktion Liter pro Std.	CO_2-Produktion ccm/kg Min.	O_2-Verbrauch Liter pro Std.	O_2-Verbrauch ccm/kg Min.	Respirationsquotient
491 reduz. 422	1,266	9,18	1,75	12,6	0,73
491 „ 422	1,413	10,23	1,91	13,8	0,74
480 „ 406	1,301	9,42	1,717	12,03	0,70
483 „ 407	1,425	10,29	1,90	13,7	0,75
431 „ 375	1,58	10,75	2,107	14,33	0,75
476 „ 389	1,47	10,00	2,07	14,09	0,71
487 „ 398	1,53	10,408	2,069	14,05	0,74

Die Mittelwerte für CO_2 und O_2 betragen für diese Versuchsreihe 10,04 ccm/kg/Min. bzw. 13,52 ccm/kg/Min., was gegenüber den Normalwerten eine Erhöhung um 5 Proz. bedeutet.

Die intravenöse Injektion von Ringerlösung hat also bei dieser Dosis eine geringe Steigerung des Stoffwechsels zur Folge, und zwar so, daß dieser Ausschlag nach oben um $^1/_{20}$ kaum als etwas anderes gedeutet werden kann als eine innerhalb der gewöhnlichen Grenzen sich bewegende Schwankung des normalen Grundumsatzes.

Ganz anders gestalten sich die Verhältnisse, wenn wir diese Stoffwechselversuche anstellen, nachdem wir den Versuchstieren parenteral Eiweiß, und zwar artfremdes, zugeführt haben. Unser Interesse lenkt sich dabei nach zwei Richtungen. Wir fragen uns: 1. Wie wirkt das parenteral einverleibte Eiweiß an und für sich in verschiedenen Dosen auf den respiratorischen Grundumsatz? 2. Machen sich bei wiederholten Injektionen beim nämlichen Tiere Erscheinungen geltend, die als Überempfindlichkeit oder im Gegensatz hierzu als Gewöhnung gedeutet werden können?

Betrachten wir die erste Frage für sich gesondert: Wie wirkt das intravenös injizierte Eiweiß in verschiedenen Dosen auf den respiratorischen Grundumsatz?

Es werden einem Versuchstiere 0,5 bis 3 ccm Pferdeserum intravenös injiziert und anschließend der Stoffwechselversuch ausgeführt (s. Tabelle III).

Nach Ablauf je einer Stunde werden Gasproben entnommen und analysiert. Der erste Versuch ergibt Werte, die gegenüber der Norm bedeutend herabgesetzt sind. Nach einer weiteren Stunde finden wir den Umsatz bereits etwas höher, aber immer noch unter der Norm, und zwar ergibt sich als Mittelwert aus beiden Proben eine *Verminderung des Grundumsatzes um 30 Proz.*

Tabelle III.

Serum- und Normalversuche. (Kaninchen 1.)

Datum	Ventilation Liter pro Std.	CO_2-Produktion Liter pro Std.	CO_2-Produktion ccm/kg-Min.	O_2-Verbrauch Liter pro Std.	O_2-Verbrauch ccm/kg-Min.	Respirationsquotient	Bemerkungen
1922							
3. II.	348 reduz. 370	0,629	5,0	1,036	7,8	0,64	0,5 ccm Pferdeserum intraven.
	424 „ 366	0,9882	7,5	1,3542	10,3	6,73	
6. II.	480 „ 414	0,8694	6,52	1,3662	10,3	0,63	1,0 ccm Serum intravenös
	384 „ 333	0,8658	6,5	1,2321	9,25	0,7	
14. II.	453 „ 390	1,17	9,0	1,638	12,4	0,733	Normalversuch
16. II.	394 „ 361	1,444	10,5	1,772	13,0	0,703	2 ccm Serum intravenös
	389 „ 349	1,805	13,1	2,349	17,0	0,77	
17. II.	480 „ 407	0,9361	6,9	1,2617	9,4	0,73	2 ccm Serum intravenös
	486 „ 414	1,656	12,2	2,277	16,12	0,75	
21. II.	430 „ 380	1,534	10,23	2,1	14,0	0,73	3 ccm Serum intravenös
	464 „ 410	1,681	11,2	2,37	15,8	0,74	
	466 „ 409	1,676	11,2	2,35	16,0	0,7	
	508 „ 446	1,794	12,0	2,41	16,2	0,74	
25. II.	467 „ 401	1,323	9,12	1,865	12,9	0,71	Normalversuch
	470 „ 402	1,418	10,01	1,89	13,2	0,76	
14. III.	576 „ 490	0,98	7,24	1,34	9,92	0,73	3 ccm Serum intravenös
	476 „ 410	1,00	7,57	1,36	10,27	0,737	
	467 „ 400	1,04	7,89	1,45	10,90	0,72	
	422 „ 361	0,974	7,4	1,31	10,00	0,74	

Ein weiterer Versuch nach Injektion von 1,0 ccm Pferdeserum hat eine Verminderung des Umsatzes um 25 Proz. zur Folge.

Eine sukzessive Erhöhung der Serumdose läßt die negative Schwankung des Umsatzes verschwinden und läßt an ihrer Stelle eine Erhöhung derselben in Erscheinung treten. So sehen wir im dritten Serumversuch nach Injektion von 2 ccm Pferdeserum, daß in der ersten Stunde die erniedrigten Werte schon den annähernd normalen Zahlen Platz gemacht haben, und in der zweiten Stunde sehen wir den Grundumsatz maximal emporschnellen, indem wir eine Erhöhung derselben durchschnittlich um 30 Proz. feststellen.

Wir gehen nun mit der Serumdosis auf 3 ccm und bemerken, daß auch hier die anfängliche negative Schwankung ausbleibt und dafür von einer Steigerung des Stoffwechsels abgelöst wird. Merkwürdigerweise erreicht diese Steigerung nicht mehr die bei 2 ccm Serum erreichte mittlere Höhe, sondern bleibt mit 20 Proz. Erhöhung des Umsatzes hinter jenen Werten zurück, so daß wir, ohne damit etwas präjudizieren zu wollen, im allgemeinen sagen können, daß die größten Ausschläge in den Gesamtumsatz nach unten bei minimalen Dosen auftreten, die größten Ausschläge nach oben aber bei mittleren Dosen in Erscheinung treten.

Ob diese Dinge wirklich an der verschiedenen Dosierung liegen, oder ob andere Ursachen dabei mit im Spiele sind, werden wir später zu entscheiden suchen.

Tabelle IV. Serum- und Normalversuche. (Kaninchen 2.)

Datum	Ventilation Liter pro Std.	CO_2-Produktion Liter pro Std.	CO_2-Produktion ccm/kg-Min.	O_2-Verbrauch Liter pro Std.	O_2-Verbrauch ccm/kg-Min.	Respirationsquotient	Bemerkungen
1922 18. II.	477 reduz. 408	1,569	10,8	2,092	14,4	0,75	Normalversuch
	480 „ 410	1,397	9,97	1,9	13,6	0,73	
	520 „ 444	1,02	7,23	1,4	10,0	0,73	
22. II.	447 „ 300	1,282	9,09	1,83	12,98	0,70	Injektion von 1 ccm Pferdeserum intraven.
	508 „ 434	1,4756	10,53	2,05	14,6	0,72	
	501 „ 428	1,548	10,9	2,14	15,1	0,72	
	507 „ 430	1,457	10,12	2,07	14,45	0,71	
7. III.	505 „ 429	1,624	11,3	2,25	15,7	0,72	Injektion von 2 ccm Serum intravenös
	490 „ 415	1,613	11,2	2,15	14,9	0,75	
10. III.	480 „ 407	1,325	9,135	1,77	12,2	0,75	Normalversuch
	481 „ 408	1,397	9,62	1,89	13,0	0,74	
	491 „ 416	1,412	9,74	1,91	13,2	0,74	
18. III.	487 „ 414	1,503	10,42	2,03	13,9	0,75	Injektion von 3 ccm Pferdeserum intraven.
	478 „ 403	1,497	10,39	2,11	14,35	0,71	
	482 „ 406	1,468	10,25	2,09	14,7	0,70	
	584 „ 500	1,3	9,5	1,857	13,57	0,70	
21. III.	520 „ 447	1,235	8,29	1,69	11,36	0,73	Normalversuch

An einem zweiten Versuchstiere wurden nun in einem gleichen Zeitraum Parallelversuche angestellt, und zwar wurde es ebenfalls nach Injektion von steigenden Mengen Pferdeserum (1,0 bis 3,0 ccm intravenös) auf seine Stoffwechselverhältnisse geprüft (s. Tabelle IV).

Die Herabsetzung des Grundumsatzes bei kleinen Dosen intravenös applizierten artfremden Serums und im Beginn der Versuchsreihe, der spätere Anstieg auf die Norm und die sukzessive eintretende Erhöhung derselben, wie sie in der vorhergehenden Untersuchungsserie in Erscheinung trat, waren nicht zufälliger Natur, sondern sie zeigten sich bei dieser zweiten, unter den nämlichen Bedingungen ausgeführten Versuchen in ganz der gleichen Weise.

Die anfängliche *Erniedrigung* des Umsatzes betrug hier bei Injektion von 1,0 ccm Pferdeserum 25 Proz. Bei der Dosis von 2,0 ccm blieb die Erniedrigung von vornherein aus, zeigte sich im Gegenteil eine geringe Steigerung, die auch hier bei der nämlichen Dosierung von 2,0 ccm den maximalen *Mittelwert von 28 Proz. erreicht.*

Es zeigte sich auch hier, analog der letzten Versuchsserie, die eigentümliche Erscheinung, daß bei höheren Dosen, 3 ccm Serum, die Erhöhung des Grundumsatzes weniger deutlich ausgesprochen ist wie

die bei Injektion von 2 ccm. Im Prinzip haben wir in beiden Serien durchweg die identischen Vorgänge zu verzeichnen, nämlich Erniedrigung des Umsatzes bei kleinen Dosen und im Beginn der Versuche Anstieg auf und über die Norm bei steigenden Dosen im Verlauf der Versuchsreihe und Herabsinken auf die Norm in der Zwischenzeit, wie die eingeschalteten Normalversuche angeben.

Diese auffälligen Tatsachen leiten uns über zur zweiten Frage: Machen sich bei wiederholten Injektionen artfremden Eiweißes bei demselben Tiere Erscheinungen von Überempfindlichkeit oder Gewöhnung geltend?

Die Tatsache, daß im Verlauf der beschriebenen Versuchsreihen die Ausschläge einmal nach der negativen und einmal nach der positiven Seite hingehen, könnte vielleicht so gedeutet werden, daß es die *Wiederholung* der parenteralen Eiweißzufuhr bei demselben Tiere ist, die es zu so verschiedenen Reaktionen veranlaßt, *also einen Zustand der Allergie* bei ihm herbeiführt mit positiven und negativen Schwankungen.

Es könnte folglich daran gedacht werden, daß nicht die verschiedene Dosierung diese Schwankungsunterschiede hervorruft, sondern daß unabhängig davon in der ersten Periode, solange sich die Kurve des Grundumsatzes nach der negativen Seite hin und zurück auf die Norm und nach der positiven Seite bis zur maximalen Erhöhung bewegt, dies als Ausdruck einer gewissen Überempfindlichkeit anzusehen sei. Umgekehrt würde das Verschwinden der negativen Phase nach mehreren Injektionen, ferner das Absinken der positiven Ausschläge gegen die Norm zu (auch bei größeren Dosen) einer Gewöhnung des Tieres an artfremdes Eiweiß entsprechen.

Ich möchte mit einiger Reserve die Mutmaßung äußern, daß die wiederholte parenterale Eiweißzufuhr in Form artfremden Blutserums beim Kaninchen innerhalb bestimmter Grenzen unabhängig von der Dosierung sich in zwei gegensätzlichen Wirkungen äußert, nämlich in einer anfänglich sich steigernden *Überempfindlichkeit* und in einer darauf folgenden *Gewöhnung* an die parenterale Einverleibung von artfremdem Eiweiß.

Es bleibt jetzt noch die Frage, ob die mitgeteilten Erscheinungen ihren Grund haben in der parenteralen Einverleibung des Eiweißes als solches, oder ob das ausschlagende Moment darin bestehe, daß es sich hierbei um artfremdes Eiweiß handelt.

Um dies zu entscheiden, untersuchte ich den Grundumsatz eines weiteren Versuchstieres, das bis dahin noch keine Seruminjektion erhalten hatte, mithin für parenterale Eiweißzufuhr weder Überempfindlichkeit noch Gewöhnung zeigen konnte, und zwar nach intravenöser Injektion von arteigenem Eiweiß, indem ich ihm 2 ccm Kaninchenserum intravenös verabfolgte.

Ich wählte hierbei absichtlich die Dosis von 2 ccm, weil laut früheren Versuchen gerade bei — aber vielleicht nicht wegen — dieser Dosis die größten Ausschläge erzielt wurden, in der Erwartung, daß sich ein eventueller Unterschied in der Wirkung des artfremden und arteigenen Eiweißes am schärfsten dokumentieren würde (s. Tabelle V).

Tabelle V.
Eigenserumversuch. (Kaninchen 3.)

Datum	Ventilation	CO_2-Produktion		O_2-Verbrauch		Respirationsquotient	Bemerkungen
	Liter pro Std.	Liter pro Std.	ccm/kg-Min.	Liter pro Std.	ccm/kg-Min.		
1922 27. IV.	483 reduz. 410	1,423	9,88	1,87	13,0	0,76	Normalversuch
	491 „ 417	1,401	9,73	1,868	13,0	0,75	
30. IV.	517 „ 439	1,448	9,3	2,07	13,2	0,70	2 ccm Kaninchenserum intravenös
	520 „ 441	1,571	10,9	2,2	15,35	0,71	
12. V.	502 „ 425	1,49	10,4	2,07	14,25	6,73	
	510 „ 430	1,467	10,19	2,695	14,56	6,70	

Die Wirkung des arteigenen Serums ist also nach diesen Versuchen eine ganz *geringe Erhöhung* des Umsatzes, und zwar beträgt sie gegenüber dem Normalumsatz des gleichen Kaninchens *rund 4 Proz. im Durchschnitt.*

Es drängt sich uns hierbei unwillkürlich der Vergleich auf mit der Wirkung der intravenös injizierten Ringerlösung, die den Stoffumsatz um etwa 5 Proz. in die Höhe trieb. Damit ist auch die Frage beantwortet, die ich stellte, nämlich daß nur die parenterale Zufuhr von *artfremdem Eiweiß* die angeführten differenten Wirkungen im Gefolge hat.

Schließlich wäre noch die Frage zu behandeln, wo die Steigerung des Grundumsatzes nach parenteraler Zufuhr von artfremdem Eiweiß zustande komme. Unmittelbar geht aus meinen Versuchen nicht hervor, wohin man den Angriffspunkt zu lokalisieren habe. Man ist daher auf Erwägungen allgemeiner Natur angewiesen. Von diesen scheint mir eine wert, in Diskussion gestellt zu werden. Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß parenteral eingeführtes Eiweiß eine besondere Wirkung auf die Leber ausübe. Ausgehend von seinen Lymphstudien, bezeichnet *Asher* parenteral eingeführtes Eiweiß als Lebergift. Schließt man sich dieser Auffassung an, so könnte man die von mir gefundene Erhöhung des Grundumsatzes auf diese Wirkung des parenteral eingeführten artfremden Eiweißes als Lebergift zurückführen. Wie ich schon in der Einleitung ausgeführt habe, ist der hier angedeutete Zusammenhang kein zwingender, aber jedenfalls unterstützen sich die Tatsachen gegenseitig.

Zusammenfassung.

Wir rekapitulieren kurz die Ergebnisse unserer Arbeit und fassen sie in folgenden Schlußsätzen zusammen:

1. Kaninchen, die mit Milch und Brot ernährt werden, eignen sich sehr gut zur Untersuchung des respiratorischen Grundumsatzes in einer *Jaquet*schen Kammer.

2. Normale Tiere haben einen durchschnittlichen Umsatz von CO_2 = 9,5585 cmm pro Kilogramm und pro Minute, O_2 = 12,94 cmm pro Kilogramm und pro Minute bei einem mittleren respiratorischen Quotienten von 0,7374.

3. Der Grundumsatz nach intravenöser Injektion von Ringerlösung bleibt praktisch unverändert.

4. Nach intravenöser Injektion von artfremdem Eiweiß sinkt der Grundumsatz anfänglich um durchschnittlich 30 Proz., um später um den gleichen Grad über die Norm zu steigen. Totale Schwankungsdifferenz 60 Proz.

5. Das arteigene Eiweiß läßt wie die Ringerlösung den Grundumsatz praktisch unbeeinflußt.

6. Aus diesen Tatsachen geht hervor, daß das artfremde Eiweiß selbst in kleinen Mengen kräftigen Einfluß auf den Stoffwechsel ausübt.

7. Es machen sich hierbei Erscheinungen geltend, die einerseits als Überempfindlichkeit, andererseits als Gewöhnung angesehen werden können.

8. Es kann daran gedacht werden, die Steigerung des Grundumsatzes durch parenteral eingeführtes artfremdes Eiweiß auf die Eigenschaft des letzteren, im Sinne *Ashers* als „Lebergift" zu wirken, in die Leber zu lokalisieren.

Über die Spaltung von Hexose-di-phosphorsäure durch verschiedene Organe.

Von

Y. Takahashi.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 30. November 1923.)

In den mannigfachen Arbeiten über die Wirkung der *Phosphatasen*, die in den letzten Jahren im hiesigen Institut ausgeführt worden sind, hat sich ergeben, daß sowohl die natürlichen Zucker-phosphorsäureester als auch künstlich bereitete Vertreter dieser Körperklasse enzymatisch gespalten werden. Entsprechende Fermente finden sich weit verbreitet im Tier- und Pflanzenreiche, wie aus den Arbeiten von *Neuberg* mit *Karczag* und *Djenab*, *Akamatsu*, *Tomita*, *Noguchi* sowie aus den Mitteilungen von *Němec* hervorgeht; außer auf diese Feststellungen[1]) verweise ich noch auf die Beobachtungen von *Forrai*[2]), der Phosphatasen des menschlichen Organismus geprüft hat.

Wegen der möglichen Beziehungen zwischen dem Hexose-di-phosphat, das durch Hefe gebildet wird, zu der Kohlenhydrat-phosphorsäureverbindung, die in der Muskulatur auftritt, bot eine Untersuchung über das Verhalten von tierischen Phosphatasen zur Hexose-di-phosphorsäure einiges Interesse. Allerdings neigt diese Substanz in freier Form oder in Gestalt ihrer löslichen Salze zu nicht unbeträchtlichem Selbstzerfall, und es ist an sich bequemer, mit der beständigeren Hexose-mono-phosphorsäure zu arbeiten, die man nach *Neuberg* leicht durch partielle Hydrolyse aus dem Di-phosphat gewinnen kann. *M. Tomita* hat gezeigt, daß die Organe des Warm- und Kaltblüters ein Ferment

[1]) Diese Zeitschr. **36**, **82**, **88**, **93**, **119**, **131**, **142**, **143** (1911–1923).
[2]) Ebendaselbst **142**, 282, 1923.

enthalten, das die durch Abbau von Hexose-di-phosphat bereitete Hexose-mono-phosphorsäure *Neubergs* spaltet, und er hat darauf hingewiesen, daß bei der ungleichen Haftfestigkeit von zwei Phosphorsäureresten am Zuckermolekül vielleicht auch die enzymatische Hydrolyse des Di-phosphorsäureesters über die Stufe der Mono-phosphorsäure führt. *Tomita* hat weiter angegeben, daß Unterschiede beispielsweise zwischen der Verseifung von Hexose-mono-phosphorsäure und Rohrzucker-mono-phosphorsäure durch tierische Organe bestehen, so daß man für diesen Zerfall zwar ähnliche, aber doch ungleiche Phosphatasen verantwortlich zu machen hat.

Im Anschluß an die Arbeiten von *M. Tomita*[1]) habe ich nun die Muttersubstanz des von diesem Autor verwendeten Hexose-mono-phosphats, die Hexose-di-phosphorsäure, in den Kreis der Untersuchungen gezogen. Geprüft habe ich das Verhalten des hexose-di-phosphorsauren Natriums gegen Milz, Muskel und Niere des Meerschweinchens und habe gefunden, daß am kräftigsten die Niere einwirkte, sodann die Milz, während das schwächste Hydrolysierungsvermögen dem Muskel zukam. Dieser Befund steht vollkommen im Einklange mit den Beobachtungen von *Tomita* (l. c.) hinsichtlich der Spaltungskraft, welche die Organe gegenüber den Salzen der Hexose-mono-phosphorsäure sowie auch der Rohrzucker-mono-phosphorsäure aufweisen.

Es scheint mir vor der Hand müßig, Schlüsse aus dieser Verteilung der zerlegenden Fähigkeiten bei den einzelnen Organen zu ziehen, und ich beschränke mich auf die Wiedergabe einiger Versuche.

Wegen der nicht unerheblichen Neigung des hexose-di-phosphorsauren Natriums zur freiwilligen Zersetzung waren in allen Fällen drei Ansätze nötig: 1. wurde ein Gemisch von Organ und Substrat bei Gegenwart von Toluol als Antiseptikum angestellt; 2. wurde die gleiche Organmenge für sich digeriert, und 3. wurde die wässerige Lösung des hexose-di-phosphorsauren Natriums gleichzeitig mit den Proben 1 und 2 im Brutschrank belassen.

Portion 3 gab Auskunft über die durch spontane Loslösung frei gewordene Menge anorganischen Phosphats. Ansatz 2 gestattete die Ermittlung der bei der Autolyse von Organmaterial für sich auftretenden Phosphorsäuremengen. Unter Berücksichtigung der in den Ansätzen 2 und 3 gefundenen Quantitäten freien Phosphats konnte ich

[1]) *Tomita,* diese Zeitschr. **131**, 161 und 170, 1922.

die im Organversuch aus dem Substrat freigemachte Menge Phosphorsäure des Ansatzes 1 richtig berechnen.

Die Bestimmung der Phosphorsäure erfolgte in üblicher Weise als Magnesium-pyro-phosphat. Aus dem schon von *Tomita* angegebenen Grunde verzichtete ich auf die Anwendung von Puffersystemen und arbeitete lediglich bei der Reaktion, die in den autolysierten Organen sich einstellt. Das Substrat, das hexose-di-phosphorsaure Natrium, bereitete ich aus dem reinen Bariumsalz durch genaue Umsetzung mit kalter verdünnter Schwefelsäure und vorsichtige Neutralisation der so gewonnenen freien Säure mit eiskalter Natronlauge (Indikator Lackmus).

Versuch 1: 100,0 ccm der hier und im folgenden beinahe 1 proz. Lösung von hexose-di-phosphorsaurem Natrium, 5,0 g Muskelbrei, 1,5 ccm Toluol.

Versuch 2: 100,0 ccm Wasser, 5,0 g Muskelbrei, 1,5 ccm Toluol.

Versuch 3: 100,0 ccm 1 proz. Lösung von Natrium-hexose-di-phosphat, 5,0 g Nierenbrei, 1,5 ccm Toluol.

Versuch 4: 50,0 ccm Wasser, 2,5 g Nierenbrei, 0,75 ccm Toluol.

Versuch 5: 20,0 ccm Natrium-hexose-di-phosphat, 1,0 g Milzbrei, 0,3 ccm Toluol.

Versuch 6: 10,0 ccm Wasser, 0,5 g Milzbrei, 0,25 ccm Toluol.

Versuch 7: 100,0 ccm hexose-di-phosphorsaures Natrium, 5,0 ccm Wasser, 1,5 ccm Toluol.

Die verwendeten Organe entstammten verschiedenen frisch getöteten Tieren. Das gleichartige Material wurde unmittelbar vor Beginn des Versuches gemischt und fein zerkleinert. Wie sich die Ergebnisse gestalten, lehrt folgende tabellarische Übersicht, welche den Verlauf der enzymatischen Spaltung nach 2 und 4 Tagen verzeichnet. Da 100,0 ccm der verwendeten Lösung von hexose-di-phosphorsaurem Natrium nach meinen Analysen 0,3872 g Gesamtphosphorsäure ($-PO_4$) enthalten hatten, so belief sich die Spaltung bei der Niere auf 61,28 Proz., bei der Milz auf 50,05 Proz. und bei der Muskulatur auf 32,80 Proz.

	Hauptversuch	Kontrolle I (Extrakt)	Kontrolle II (Na-Salzlösung)
	PO_4 nach 2 Tagen		
Niere	0,2840	0,0426	0,0463
Milz	0,2644	0,0535	
Muskel	0,1868	0,0533	
	PO_4 nach 4 Tagen		
Niere	0,3459	0,0541	0,0545
Milz	0,3036	0,0553	
Muskel	0,2363	0,0548	

Zu bemerken ist, daß *v. Euler*[1]) als erster die Zerlegbarkeit von Hexose-di-phosphat durch tierische Zellen konstatiert hat. Er fand für Glycerinextrakte der Darmschleimhaut vom Schwein und Kaninchen ein zwar schwaches, aber meßbares Spaltungsvermögen; etwas stärker, jedoch langsam, verlief die Hydrolyse durch den Auszug von Pferdeniere. Für den Muskelpreßsaft haben *Embden*, *Griesbach* und *Schmitz*[2]) und für den Uteruspreßsaft hat *Hagemann*[3]) die Fähigkeit angegeben, Hexose-di-phosphat zu hydrolysieren.

Schon heute erwähne ich, daß sowohl die natürliche Hexose-di-phosphorsäure als die *Neuberg*sche Hexose-mono-phosphorsäure auch von *Fermenten des Femurs* gespalten werden; im Hinblick auf eine jüngst erschienene Arbeit von *Robison*[4]), die zwar mit einem isomeren Phosphorsäureester ausgeführt ist, werde ich in Kürze darüber berichten.

---

[1]) *H. v. Euler*, H. **79**, 376, 1912.
[2]) *G. Embden*, *W. Griesbach* und *E. Schmitz*, H. **93**, 38, 1914/15.
[3]) *H. Hagemann*, H. **93**, 54, 1914/15.
[4]) *R. Robison*, Chem. Centralbl. **1923**, III, 870.

Über Gelatine-schwefelsäure und Casein-schwefelsäure.

Von

J. Hatano.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1923.)

Verbindungen der Schwefelsäure mit den Kohlenhydraten kommen in der Natur vor und sind auch künstlich dargestellt worden. Sie haben eine besondere Bedeutung dadurch erlangt, daß sich verschiedene wichtige Polysaccharide als hochmolekulare Ester der Schwefelsäuren entpuppt haben; dies gilt z. B. außer für den seit langem bekannten Kohlenhydratanteil der tierischen Mucoide für eine Gruppe von Pflanzenschleimstoffen.

Organische Schwefelsäureverbindungen der Proteine hat man bisher nicht als Naturprodukte angetroffen. Die früher des öfteren in der Literatur auftretende Behauptung, daß außer dem mit alkalischer Bleilösung leicht nachweisbaren Schwefel sich dieser zum Teil in höher oxydierter Form in einigen Proteinen vorfinden sollte, ist seit *Mörners* Entdeckung des Cystins unter den Eiweißbausteinen nicht mehr aufrecht erhalten worden; denn selbst aus reinem Cystin bzw. Cystein wird nur ein Teil des Schwefels leicht in Form von Schwefelblei abgegeben. Hinzu kommt, daß in manchen Fällen auch eine Beimengung von sogenannten Glykothionsäuren, Verwandten der Chondroitinschwefelsäure, vorgelegen haben dürfte.

Immerhin erscheint es nicht ausgeschlossen, daß auch unter den echten Proteinen Schwefelsäure-derivate vorhanden sind, durch deren Auffindung wir ebenso überrascht werden könnten, wie durch die Feststellung des Ätherschwefelsäuren-charakters bestimmter Polysaccharide. Weiter kommt hinzu, daß es lediglich zwei bestimmte anorganische Säuren sind, deren sich die lebenden Wesen zur Schaffung esterartiger Gebilde bedienen: die Phosphorsäure *und* die Schwefelsäure. Phosphorsäureester sind nicht nur in der Kohlenhydratgruppe, sondern auch in der Proteinreihe bekannt.

Vor Jahren haben nun *C. Neuberg* und *H. Pollak*[1]) gezeigt, daß man künstlich in das Molekül von Eiweißverbindungen Phosphorsäureradikale einfügen und auf diesem Wege zu caseinartigen Substanzen gelangen kann. Es handelt sich dabei um organische Abkömmlinge der Phosphorsäure, die entweder an freie Hydroxylreste oder an die Aminogruppen der im Eiweiß vorhandenen Aminosäuren gekoppelt ist, d. h. es liegen Phosphorsäure-ester oder substituierte Phosphaminsäuren vor.

Nach denselben Prinzipien gelingt es nun, auch Schwefelsäure in das Molekül von Eiweißkörpern einzuführen.

Zunächst untersuchte ich das Verhalten von *Gelatine* und *Casein* nach dieser Richtung und bediente mich dabei auf Rat von Prof. *Neuberg* desselben Vorgehens, das in seinem Laboratorium mit Erfolg zur Synthese verschiedener Kohlenhydrat-schwefelsäureester gedient hat, nämlich der Einwirkung von Chlorsulfonsäure in Chloroformlösung auf die Suspension der genannten Proteine in wasserfreiem Pyridin.

Es glückte auf diese Weise, organische Derivate der Schwefelsäure zu erhalten, in denen die genannte Mineralsäure mit dem Eiweiß fest verknüpft ist. Erst bei längerem Kochen mit starken Säuren wird die Schwefelsäureverbindung gespalten. Es bleibe vorläufig dahingestellt, ob es sich um Schwefelsäureester oder um substituierte Sulfaminsäuren handelt.

Die durch den angebrachten Schwefelsäurerest gekennzeichneten Eiweißkörper sollen zu fermentativen Studien dienen; auch soll versucht werden, das erwähnte Verfahren auf höhere und niedere Spaltungsprodukte der genuinen Proteine anzuwenden.

A. Gelatine-schwefelsäure.

3 g feinst gepulverter Speisegelatine[2]) wurden nach vorheriger sorgfältiger Trocknung zur Gewichtskonstanz in einem Gemenge von 20 ccm Chloroform und 10 ccm Pyridin aufgeschlämmt. Unter Kühlung mit Wasser wurde langsam eine Mischung von 10 ccm wasserfreiem Chloroform und 2 ccm frisch destillierter Chlorsulfonsäure tropfenweise hinzugegeben. Die Chlorsulfonsäure floß durch einen Tropftrichter zu der Gelatinesuspension, die in einem gegen Luftfeuchtigkeit geschützten Gefäße mittels eines unter Quecksilberverschluß laufenden Rührers turbiniert wurde. Nach sechsstündiger Dauer wurde mit der gleichen Menge absoluten Alkohols verdünnt und die flockige Substanz auf dem Filter mit Spiritus gewaschen. Wegen der Klebrigkeit und elastischen

---

[1]) *C. Neuberg* und *H. Pollak*, Ber. **43**, 2060, 1910; diese Zeitschr. **26**, 529, 1910.

[2]) Wir verdanken das Material dem Entgegenkommen der Aktienges. für chemische Produkte vorm. H. Scheidemandel, Berlin.

Beschaffenheit der Gelatineverbindung gelingt es jedoch nicht, mittels Weingeist sämtliche anhaftende anorganische Schwefelsäure zu entfernen. Daher wurde die sulfurylierte Gelatine in möglichst wenig warmem Wasser (etwa 15 ccm) gelöst, dann wurde mit 500 ccm Aceton gefällt, das tropfenweise zugegeben wurde. Der Niederschlag ließ sich nunmehr auf einer Nutsche leicht absaugen und mit Aceton auswaschen. Diese Behandlung wurde noch einmal wiederholt.

Der so gewonnene Körper war frei von Sulfat- und Chlor-ionen. Durch Trocknung bei 100° nahm die Substanz eine dehnbar-gummiartige Beschaffenheit an, ließ sich aber nach dem Erkalten in einer Reibschale pulvern.

Das im Hochvakuum zur Gewichtskonstanz gebrachte Material wies nach Soda-Salpeter-Schmelze (im Durchschnitt mehrerer Analysen) einen Gehalt von 1,77 Proz. Schwefel auf, während die verwendete Gelatine 0,35 Proz. Schwefel enthalten hatte.

Analysen.

α) Gelatine-schwefelsäure:

0,6373 g Substanz: 0,0813 g $BaSO_4$ = 1,765 Proz. S;
0,4734 g Substanz: 0,0610 g $BaSO_4$ = 1,770 Proz. S.

β) Gelatine:

0,5044 g Substanz: 0,0134 g $BaSO_4$ = 0,364 Proz. S;
0,5110 g Substanz: 0,0131 g $BaSO_4$ = 0,352 Proz. S.

Die Schwefelsäure ist in diesem Gelatinederivat fest verankert. Beim Kochen mit verdünnter Salzsäure werden keine Sulfat-ionen abgespalten. Erst bei längerem Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure in Gegenwart von Bariumchlorid scheidet sich Bariumsulfat ab. Beschleunigt wird die Zersetzung bei Zugabe von Salpetersäure und von Wasserstoffsuperoxyd nebst einer Spur Eisenchlorid nach *Mandel* und *Neuberg*[1]). Die Anwendung der Oxydationsmittel zum Nachweise der esterartig gebundenen Schwefelsäure ist statthaft, weil die gleiche Quantität nicht sulfurylierter Gelatine unter den angegebenen Bedingungen kein Bariumsulfat bildete, das aus Cystinschwefel hätte entstehen können. Bei längerer Aufbewahrung der Substanz wird Schwefelsäure abgegeben.

B. Casein-schwefelsäure.

1. Zu einer Suspension von 3 g wasserfreiem reinsten Casein (nach *Hammarsten*) in 40 ccm absolutem Pyridin wurde in der für Gelatine beschriebenen Art ein Gemisch von 40 ccm frisch rektifiziertem Chloroform mit 2 ccm Chlorsulfonsäure Tropfen für Tropfen hinzugefügt.

---

[1]) *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 71, 196, 1915.

Die schließlich resultierende feste Substanz wurde abgesaugt; wegen ihrer geringen Löslichkeit in Wasser konnte einfach mit H_2O gewaschen werden, bis in der ablaufenden Flüssigkeit keine Sulfat- und Chlorionen mehr nachweisbar sind.

Die zur Gewichtskonstanz getrocknete Verbindung zeigte einen Schwefelgehalt von 0,84 Proz.

0,4836 g Substanz: 0,0296 g $BaSO_4$ = 0,84 Proz. S.

Kontrolle mit Casein:

0,4575 g Substanz: 0,0207 g $BaSO_4$ = 0,62 Proz. S.

2. In einem anderen Falle wurde bei gleicher Behandlung ein sulfuryliertes Casein erhalten, das 1,37 Proz. S enthielt.

0,4835 g Substanz: 0,0488 g $BaSO_4$ = 1,38 Proz. S.

Über die Eigenschaften der Substanz ist folgendes zu bemerken. Sie löst sich in Laugen wie Ammoniak; beim Aufbewahren wird Schwefelsäure abgespalten.

Die Gegenwart von Schwefelsäure in organischer Bindung läßt sich für das sulfurylierte Casein auf genau die gleiche Weise dartun, wie es vorher für die entsprechende Verbindung der Gelatine beschrieben worden ist.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

Über Taka-Lactase.

Von

C. Neuberg und O. Rosenthal.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

In Fortsetzung der im hiesigen Institut gemachten Beobachtungen betreffs des *Reichtums der Takadiastase an den allerverschiedensten Fermenten* (s. die früheren Veröffentlichungen von *C. Neuberg* und *K. Kurono*, *K. Linhardt*, *S. Akamatsu*, *J. Noguchi*, *Y. Takahashi* sowie von *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*) registrieren wir die Anwesenheit eines *Labenzyms*, einer Hippursäure spaltenden *Amidase* sowie einer *Lactase* und berichten zunächst über die letztere.

Nach den Angaben, die im nachstehenden angeführt werden, ist die „*Takalactase*“ befähigt, den *Milchzucker praktisch vollkommen zu hydrolysieren*. Eine 5proz. Milchzuckerlösung kann in ungefähr 200 Stunden angenähert quantitativ zerlegt werden. An der Steigerung des optischen Drehungsvermögens sowie an der Zunahme der Reduktionskraft kann man den Fortgang des enzymatischen Abbaues verfolgen.

Am Ende desselben zeigt auch die *Osazonprobe* an, daß in heißem Wasser leicht lösliches Lactose-phenyl-osazon nur noch in Spuren vorhanden ist und fast ausschließlich ein Gemisch von d-Glucosazon mit d-Galaktosazon vorliegt.

Befreit man die mit dem Ferment digerierte Substratflüssigkeit durch Eindampfen bei niederer Temperatur von dem als Desinfiziens zugegebenen Toluol, so tritt sowohl mit obergäriger als mit untergäriger Hefe schon in wenigen Minuten kräftige Gärung ein. Die von uns verwendeten gewöhnlichen Heferassen vermochten den Milchzucker nicht anzugreifen, so daß die sich einstellende Vergärungsfähigkeit gleichfalls einen Beweis für den Abbau zu den Monosacchariden bietet.

Das Gesamtpräparat der Takadiastase, die aus dem Pilz Aspergillus oryzae dargestellt wird, verhält sich somit gegenüber Lactose — genau wie wir es jüngst bezüglich der Cellobiose[1]) beobachtet haben —

[1]) *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*, diese Zeitschr. **143**, 399, 1923.

anders als der aus dem betreffenden Mikroorganismus gewonnene Preßsaft; denn in diesem war weder Cellase noch Lactase auffindbar[1]). Verwiesen sei noch auf die Angabe von *H. Pottevin*[2]), daß auch die Glykosidase des nicht an Lactose akklimatisierten Aspergillus niger den Milchzucker nicht spaltet.

Als ein *Beispiel* diene folgende Versuchsbeschreibung:

5,0 g Milchzucker wurden in 100 ccm Wasser unter Zugabe von 1 ccm Toluol gelöst; nach 24 Stunden wurde Takadiastase (5,0 g) hinzugefügt und 15 Minuten kräftig geschüttelt. Von diesem Gemische wurde jeweils 1,0 ccm entnommen und auf 25,0 ccm mit Wasser aufgefüllt. Das Reduktionsvermögen wurde nach der Methode von *Pavy-Kumagawa-Sutō* ermittelt, bei der die Gegenwart kleiner Mengen stickstoffhaltiger Substanz, dem Enzymmaterial entstammend, nicht störend wirkt.

Die für die Titration günstige Zuckerkonzentration von 0,2 Proz. war durch die vorgenommene 25fache Verdünnung erreicht. Die erzielten Ausschläge sind in nachstehender tabellarischer Übersicht verzeichnet.

	Zur Reduktion von 40 ccm der ammoniakal. Kupfermischung wurden von der 25fach verdünnten Zuckerlösung verbraucht	Die Daten entsprechen einem Gehalt der Urlösung an	
		Lactose	hydrolysierter Lactose
	ccm	Proz.	Proz.
Vor Fermentzusatz . .	8,8	5,057	—
Nach 15 Minuten . . .	8,0	—	—
„ 24 Stunden . . .	6,9	—	—
„ 72 „ . . .	6,1	—	—
„ 154 „ . . .	5,6	—	—
„ 216 „ . . .	5,4	—	5,045

Der Ansatz war die ganze Zeit im Thermostaten bei 37° aufbewahrt. Aus den von *Y. Shimidzu*[3]) mitgeteilten Daten kann man berechnen, daß zum Schluß 96,5 Proz. des Milchzuckers enzymatisch zerlegt worden waren.

Der erwähnte Ausfall der Reaktion mit Phenylhydrazin sowie die Anstellung von Gärungsproben bestätigten dieses Ergebnis.

Die *Existenz und Wirksamkeit* der in der Takadiastase vorhandenen *Lactase kann man auch auf folgende Art demonstrieren.*

Gewöhnliche Hefe vergärt bekanntlich die Lactose nicht; wie wir fanden, erfolgt aber *Vergärung, wenn man gewöhnliche Hefe in Anwesenheit von Takalactase auf Milchzucker einwirken läßt.*

---

[1]) *H. Pringsheim* und *G. Zemplén*, H. 62, 382, 1909.

[2]) *H. Pottevin*, Ann. de l'Inst. Pasteur. 17, 31, 1903.

[3]) *Y. Shimidzu*, diese Zeitschr. 13, 243, 1908.

a) Setzt man zu 20 ccm 5proz. Milchzuckerlösung 1 g untergärige Hefe sowie 0,5 g Takalactase, so ist bei 30° nach einer halben Stunde die Gärung bereits im Gange und schreitet dann schnell fort, während eine Kontrollprobe mit Milchzuckerlösung und Hefe ohne Ferment selbst innerhalb 24 Stunden keine Kohlensäure entwickelte.

b) In ein Eudiometer brachten wir 6,7 ccm einer Flüssigkeit, von der 8,0 ccm 0,24 Milchzuckerhydrat, 0,8 g Oberhefe und 0,08 g Takalactase enthielten. Nach 24 Stunden waren bei 30° 22,6 ccm CO_2 und nach 72 Stunden 26,0 ccm CO_2 frei geworden. In einem Kontrollansatz ohne Fermentzufuhr trat in 24 Stunden überhaupt kein Gas und nach 3 Tagen nur eine bedeutungslose Spur auf. Aus der Quantität des Kohlendioxyds berechnet sich die Vergärung von 0,102 g Monosaccharid.

Es war ziemlich genau die Hälfte der denkbaren Hexosemenge (von 0,201 g) vergoren. Die einfache Hefe wurde durch Zusatz der Takalactase also zur Vergärung des Milchzuckers befähigt. Beachtenswert erscheint dabei, daß die Zufügung des an Einzelfermenten überaus reichen Enzymmaterials die zymatische Wirkung der Hefe nicht zerstörte.

c) Suspendierte man 0,8 g *Lactosazon* in einem Gemisch von 95 ccm Wasser und 5 ccm absolutem Alkohol und fügte unter Beigabe von 1 ccm Toluol 0,8 g Takalactase hinzu, so erfolgte allmähliche Hydrolyse zu Galaktose und Glucosazon. Sie blieb auch bei fünftägiger Aufbewahrung des Gemenges im Brutschrank (37°) unvollständig[1]). Immerhin konnte man aber aus der filtrierten und mit Knochenkohle völlig entfärbten Flüssigkeit eine Zuckerlösung gewinnen, in der sich die Gegenwart von d-Galaktose durch kräftiges Reduktionsvermögen sowie durch die Fähigkeit zur Osazonbildung kundgab.

Selbstverständlich muß man ein Taka-Lactasepräparat verwenden, aus dem in die wässerige Flüssigkeit keine reduzierende Substanz übertritt.

---

[1]) Vgl. hierzu die älteren Beobachtungen von *C. Neuberg* und *S. Saneyoshi* (diese Zeitschr. **36**, 44, 1911) über die Spaltung des Lactosazons durch Emulsin und Kefirlactase.

Berichtigung.

In Band **144** dieser Zeitschrift, S. 564, Zeile 4 lies Kaliumdichromat statt Kaliumchromat.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundvierzigster Band

Drittes und viertes Heft

Ausgegeben am 1. März 1924



Berlin
Verlag von Julius Springer
1924

145. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 3/4.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite

Untersuchungen zur Permeabilität der Zellen.

Nr. 11.

Untersuchungen über den Einfluß des gesteigerten Blutdruckes auf den Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Gewebe.

Von

Iwata Tani.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

Die Frage, inwiefern der Blutdruck als Filtrationskraft im tierischen Organismus von Einfluß ist oder wie man es auch ausdrücken kann, ob überhaupt für den Stoffaustausch zwischen Kapillaren und Geweben die Filtration eine Rolle spielt, will nicht zur Ruhe kommen.

Namentlich bei zwei Problemen steht die Filtration immer wieder zur Diskussion. Das eine dieser Probleme ist die Abhängigkeit der Harnabsonderung vom Blutdruck. Die Absonderung des Harns als ein Filtrationsvorgang steht seit der Zeit in Diskussion, wo *Karl Ludwig* seine klassische Filtrationstheorie aufstellte. Er selbst hat in späteren Jahren außerordentlich viel dazu beigetragen, Tatsachen gegen die ausschließliche Filtrationstheorie ins Feld zu führen. Von den Anhängern der Sekretionslehre wurde eine Fülle von Arbeit geleistet, um die Unzulänglichkeit der Filtrationstheorie klarzulegen. Andererseits sind der Filtrationstheorie immer wieder auf Grund sehr beachtenswerter Experimentaluntersuchungen Anhänger entstanden, so in letzter Zeit in *Richards*, der eine Reihe von scharfsinnigen Experimenten mit ausgezeichneter Technik angestellt hat. Das andere Problem ist dasjenige des eigentlichen Stoffaustausches zwischen Blutkapillaren und Geweben, welches vornehmlich bei der Lymphbildung in Betracht kommt, aber auch sonst noch überall dort, wo die Blutkapillaren an Räume grenzen, in welche Flüssigkeit und gelöste Stoffe aus dem Blute hineintreten. Auch hier geschah die bahnbrechende Pionierarbeit von *Karl Ludwig* in seiner Filtrationstheorie, die wiederum in späteren Jahren von ihm selbst verlassen wurde. *Ludwigs* Filtrationstheorie wurde abgelöst durch die *Heidenhain*sche sogenannte Sekretionstheorie, nach welcher die Kapillarendothelien Sitz von aktiven Kräften sind, die ein abgestuftes Scheidevermögen für Wasser und gelöste Stoffe besitzen sollten. Entgegen der *Heidenhain*schen Sekretionstheorie stellte sich *Starling* auf den Boden der Filtrationstheorie auf Grund zahlreicher Versuche, aus denen er den Kapillardruck als Triebkraft erschloß. Demgegenüber gelangte *Asher* zu der Anschauung, daß das Wesentliche bei der Lymphbildung in Vorgängen gelegen sei, die ihren Sitz in den spezifischen, außerhalb der Blutkapillaren gelegenen Zellen hätten, mit anderen Worten, daß die Arbeit der Zellen

das wesentlich auslösende Moment enthielte, während die physikalisch-chemischen Kräfte innerhalb der Blutbahn im Vergleich hierzu akzessorischer Natur wären. Es ist nach allem Gesagten ersichtlich, daß weder die Harnbereitung noch die Lymphbildung ein unmittelbarer Weg sind, um die Frage zu entscheiden, ob durch Filtrationskräfte unter physiologischen Bedingungen eine Wanderung von Stoffen aus der Blutbahn in die Gewebe stattfinde. Es muß hier scharf ins Auge gefaßt werden, was eigentlich behauptet wird, wenn man Filtrationen als Triebkraft für den Stoffaustausch anspricht, und im engsten Zusammenhange hiermit steht, daß man sich aber klar sein muß, welche Bedingungen bei der Beantwortung dieser Frage innegehalten werden müssen. Es ist dem soeben Gesagten nicht immer Rechnung getragen worden.

Will man die Behauptung aufrecht erhalten, daß Filtration derjenige Vorgang ist, durch welchen der Stoffumtausch zwischen Blut und Kapillaren zustande kommt, so muß es eben ausschließlich der Druckunterschied zwischen dem Kapillarinhalt und der Umgebung sein, welcher maßgebend ist. Es dürfen keine anderen Faktoren hier beteiligt sein. Dementsprechend müssen auch die Versuchsbedingungen eingerichtet sein, indem in den betreffenden Versuchen die ausschließliche Variable der Kapillardruck ist, während die Änderung irgend eines anderen Faktors ausgeschlossen sein muß.

Am allerunmittelbarsten würde offenbar der Einblick sein, wenn es möglich wäre, das in ein Gebiet einströmende Blut und das aus demselben ausströmende Blut auf seine Unterschiede der Zusammensetzung untersuchen zu können und während der Zeit, wo das Blut durch das Untersuchungsgebiet strömt, dieses Gebiet unter genau kontrollierbaren Bedingungen zu halten. Es ist dies der Weg, den 1908 *L. Asher* in seinen Untersuchungen zur Permeabilität der Zellen und Gewebe einschlug. In diesen Untersuchungen wurde unter anderem auch die mich hier beschäftigende Frage in den Kreis der Betrachtungen gezogen. Vor dieser Arbeit waren allerdings schon Untersuchungen veröffentlicht worden, in denen insofern teilweise in dem oben genannten Sinne die Frage des Stoffaustausches zwischen Blut und Geweben geprüft worden war, als der Unterschied in der Zusammensetzung des Blutes nach verschiedenen Eingriffen analysiert worden war. Die einfachste Methode ist diejenige, bei welcher ausschließlich auf den Wasseraustritt oder -eintritt in der Blutbahn untersucht wird, d. h. wo Konzentrationsunterschiede des Blutes untersucht werden. Die Methode hierfür ist schon in *Ludwigs* Institut vielfach verwandt worden; sie besteht einfach in der Untersuchung des Hämoglobingehaltes, weil unter der Voraussetzung physiologischer Verhältnisse Hämoglobin nicht die Blutbahn verläßt und in kurzen Versuchsdauern keine merklichen Schwankungen sonstiger Art des Hämoglobingehaltes vorkommen können. Zunahme des Hämoglobingehaltes bedeutet dementsprechend Konzentrierung. Abnahme des Hämoglobingehaltes bedeutet Flüssigkeitseinwanderung aus der Umgebung in die Blutbahn, also Verdünnung des Blutes. Dieser Methode hat sich auch *Erb* im Institut von *H. Meyer* in Wien bedient, um die Frage, ob Erhöhung des Blutdruckes Konzentrationszunahme, die Erniedrigung des Blutdruckes Konzentrationsabnahme bedinge, aufzuklären. Er kam auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß dies tatsächlich zutreffe. Die Untersuchungen von *Erb* sind trotz ihrer Widerlegung durch *Asher* in die Literatur übergegangen als Beweise für das Walten von Filtrationskräften beim Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe. Erneut sollen daher die Bedingungen dieser Versuche kritisch betrachtet werden, namentlich deshalb,

weil noch einmal eine prinzipielle Erörterung über die innzuhaltenden Bedingungen angestellt zu werden verdient. *Erb* injizierte Adrenalin und erzielte dadurch eine außerordentlich starke Steigerung des arteriellen Druckes, der in seinen Versuchen gemessen wurde, und fand gleichzeitig mit Hilfe der Hämoglobinbestimmung im Anschluß hieran eine merkliche Eindickung des Blutes. Zweifach sind die methodischen Gründe, warum der Schluß auf Filtration aus diesen Versuchen nicht zulässig oder zum mindesten nicht bindend ist. Erstens ist bei der in der genannten Arbeit angewandten Methode kein Kriterium dafür gegeben, daß der Kapillardruck, auf welchen es doch schließlich ankommt, erhöht war. Gemessen wurde nur der arterielle Blutdruck. Wir wissen auf Grund der Betrachtungen von *Ernst Heinrich Weber* und auf Grund der bekannten Arbeit von *Baylis* und *Starling*, daß die Höhe des arteriellen Druckes für sich allein kein Maß für denjenigen des Kapillardruckes abgibt. Ja, nach allem, was wir vom Adrenalin wissen, kann sogar der Zustand eintreten, daß die kleinsten Arteriolen so sehr verengt sind, daß infolge der ungenügenden Durchströmung der Kapillaren geradezu ein verminderter Kapillardruck sich ausbildet.

Zweitens aber liegt ein noch viel wesentlicheres Moment in diesen Versuchen vor, welches aus methodischen Gründen Bedenken erweckt. Die Injektion von Adrenalin hat durchaus nicht die ausschließliche Wirkung, durch Vasokonstriktion den arteriellen Blutdruck zu erhöhen. Adrenalin hat noch viel tiefer gehende Wirkungen. Adrenalin ist ein Stoff, welcher die Permeabilität der Zellen verändert, und zwar in komplizierter Weise, doppelsinnig; es kann Zellen dichten, wie das der Fall beispielsweise in der Peritonealhöhle zu sein scheint; es kann aber auch Zellimpermeabilitäten oder Erschwerungen der Permeabilität vermindern, wie das der Fall innerhalb der Leberzelle ist, wo nach den Untersuchungen von *Lesser* die Abgrenzungen zwischen Glykogen und dem diastatischen Fermente gestört werden können. Aber nicht allein hat Adrenalin einen Einfluß auf die Permeabilität der Zellen, es hat auch einen solchen auf den Stoffwechsel. Schon aus seiner Eigenschaft, ganz allgemein unter physiologischen Bedingungen ein Reizmittel des Sympathicus zu sein, geht hervor, daß alle diejenigen Stoffwechselprozesse, die unter dem Einfluß des sympathischen Nervensystems stehen, durch Adrenalin angeregt werden. Durch die Arbeiten von *Asher* und seinen Mitarbeitern ist der Einfluß des autonomen Nervensystems auf die Stoffwechselprozesse hervorgehoben und mannigfach klargelegt worden.

Die Kritik der eben besprochenen Versuche hat uns auf die Punkte gebracht, die ich vorhin als prinzipiell bezeichnet habe. Bei Versuchen, in denen man den Einfluß des Blutdruckes untersuchen will, muß man dafür sorgen, daß durch diese Eingriffe weder die Permeabilität der Zellen sich ändert, noch Stoffwechselprozesse ausgelöst werden. Nur in dem Falle, wo man mit aller Strenge Permeabilitätsänderungen und Stoffwechselvorgänge in den Zellen ausschließen kann, dürften die etwa beobachteten Veränderungen auf die begleitenden Änderungen im Kapillardruck bezogen werden. Diesen strengen Bedingungen gerecht zu werden, ist durchaus nicht leicht, denn unmittelbar oder mittelbar haben die meisten unserer Eingriffe zur Folge, daß im Triebwerk des Geschehens nicht bloß der rein mechanische Faktor durchwegs

geändert wird, sondern auch solche Faktoren, die mit Permeabilität in Verbindung mit Stoffwechselvorgängen zu tun haben. Schon ganz im Anfang der Filtrationslehre hat dieser Sachverhalt eine gewissermaßen verhängnisvolle Rolle gespielt. Eine der allerfrühesten Methoden, deren man sich bediente, um den Druck zu steigern, war die venöse Stauung. Tatsächlich wurde unter dem Einfluß der venösen Stauung eine merkliche Steigerung der Lymphbildung beobachtet. Dieses Versuchsergebnis ist, historisch gesprochen, eine der wesentlichsten Grundlagen der älteren mechanischen Lymphtheorie geworden. Wir werden diese Grundlage jetzt nicht mehr anerkennen. Zwar kann durch die venöse Stauung der Blutdruck gesteigert werden, aber mit dieser venösen Stauung ist mit Sicherheit eine Änderung der Permeabilität der Zellwände gegeben, die außerordentlich empfindlich gegen die Stoffwechselprodukte sind, die im venösen Blute vorhanden sind und deren schleunige Abfuhr ein physiologisches Bedürfnis ist. Legt man diesen strengeren Maßstab an die Versuchsbedingungen an, so sieht man, daß alle Versuchsanordnungen, in deren Verlauf es irgendwie zur venösen Stauung kommt, in keinem Falle beweiskräftig für Filtrationen sein können, wenn daneben in den gleichen Versuchen auch tatsächlich Momente vorhanden sind, die bei der Filtration in das Spiel treten müssen. Wenn es z. B. richtig ist, daß bei manchen Tieren eine Muskulatur in der Vena hepatica vorhanden ist, welche auf gewisse pharmakologische und toxische Stoffe leicht anspricht, und es im Gefolge von Drucksteigerung in der Leber durch mehr oder weniger große Verengerung der Lebervene zu Erscheinungen kommt, die man im Sinne der Filtration zu deuten geneigt wäre, so ist diese Deutung eine durchaus fragliche, da eben die Änderung der Permeabilität infolge venöser Stauung von viel größerer Bedeutung ist. Und Permeabilitätsänderung der Gefäße braucht durchaus nicht die einzige Änderung zu sein, die im Anschluß an venöse Stauung eintritt. Bei dem Regulationsbestreben im Organismus ist es wohl möglich, daß auch Stoffwechselprozesse in dem umgebenden Gewebe eintreten.

Ich kehre jetzt zu der oben genannten Arbeit von *L. Asher* zurück. Derselbe war bestrebt, den oben genannten prinzipiellen Bedingungen für die Erforschung der Filtrationsfrage Rechnung zu tragen, und er bildete demnach eine Methode aus, durch welche, soweit das überhaupt möglich ist, Drucksteigerung durch ausschließlich mechanische Mittel hervorgerufen werden sollte unter Vermeidung von Permeabilitätsveränderung und unter Vermeidung von Änderung in den Stoffwechselprozessen der Zellen. Er bediente sich der hohen Aortenkompression, jenes Eingriffes, der von *Karl Ludwig* eingeführt wurde, um die mechanische Seite zur Reizung des Nervus splanchnicus zu analysieren. Dieses Verfahren brachte es mit sich, daß die Untersuchung des Blutes

unter dem Einfluß der Drucksteigerung in einem kopfwärts liegenden Gebiete angestellt werden mußte. Hier gibt es nun ein Organ, welches für Permeabilitätsuntersuchungen geradezu als vorbildlich bezeichnet werden darf, weil in ihm getrennt alle Variablen untersucht werden können, welche bei der Erforschung der Permeabilität der Zellen in Erwägung zu ziehen sind.

Dieses Organ ist die Speicheldrüse. Es läßt sich so vollständig isolieren, daß man ausschließlich das venöse Blut, welches nur aus diesen Organen kommt, auffangen kann, und man kann die Auffangemethode so gestalten, daß keinerlei Stauung im Kreislaufe eintritt, sondern vielmehr nur in dem Momente, wo man das Blut aus der Speicheldrüsenvene auffangen will, zentral die Vena jugularis abgeklemmt wird und dafür ein Seitenzweig eröffnet wird, aus dem das Blut zur Analyse gewonnen wird. Auf diese Weise ist man sicher, daß erstens das Blut nur aus dem Gebiete kommt, dessen Beeinflussung man kennt, und daß zweitens der Faktor der Stauung außer Spiel bleibt. Durch die vorhin genannte hohe Aortenabklemmung wird der Druck im ganzen Kopfgebiet, also auch in der Speicheldrüse, erhöht. Daß es sich nicht allein um Erhöhung des arteriellen Blutdruckes handelt, sondern daß auch die Kapillaren an der geänderten Mechanik des Kreislaufs teilhaftig werden, ergibt sich aus der Beobachtung bei der Auffangung des venösen Blutes. Denn genau wie bei der Reizung der gefäßerweiternden Nerven schießt das Blut beschleunigt aus der Vene heraus; die Kreislaufverhältnisse sind demnach in der gleichen Richtung geändert wie bei der Tätigkeit der Organe. An diesem Organe lassen sich aber, wie gesagt, auch alle anderen Faktoren untersuchen. Bei Reizung der Chorda tympani haben wir, weil wir die Gefäßerweiterer reizen, die gleichen Veränderungen, die soeben beschrieben wurden, dazu aber noch die Tätigkeit des Organs. Geben wir Atropin in geeigneter Dosis, so haben wir die beschriebenen mechanischen Veränderungen infolge der Gefäßerweiterung; die spezifische Tätigkeit der Speicheldrüsenzellen ist aber unterdrückt. *Asher* zeigte nun in seiner Arbeit, daß bei reiner mechanischer Drucksteigerung nicht die leiseste Andeutung einer Konzentrationsänderung des Blutes nachweisbar war. Der Hämoglobingehalt des einströmenden Arterienblutes und der Hämoglobingehalt des ausströmenden venösen Blutes war der gleiche. Demnach konnte trotz des erheblich erhöhten und in den Versuchen gemessenen arteriellen Druckes kein Wasser die Blutbahn verlassen haben. Es könnte an den Einwand gedacht werden, daß die zeitlichen Bedingungen des Versuches die Bluteindickung infolge von Abwanderung von Wasser aus den Blutgefäßen zustande kommen zu lassen, ungünstige gewesen wären. Dieser Einwand ließ sich leicht ausschließen, denn es konnte gezeigt werden, daß die Reizung der Chorda tympani

während einer ebenso kurzen Zeit wie diejenige war, die die erst beschriebene Versuchsanordnung erforderte, zu einer sehr merklichen Eindickung des Blutes führte. Hier war also in ganz analoger Weise wie in den älteren Lymphversuchen von *Asher* und *Barbèra* gezeigt worden, daß Tätigkeit des Organs Bluteindickung, also Wasserabwanderung veranlaßt, indem *Asher* und *Barbèra* vermehrte Lymphbildung nur unter dem Einfluß der Tätigkeit nachweisen konnten, in der neueren Arbeit *Asher* Bluteindickung gleichfalls nur infolge der Tätigkeit feststellte, während die bloße Blutdrucksteigerung hierzu nicht imstande war. Auch die Reizung der Chorda tympani nach Ausschluß der Tätigkeit durch Atropinisierung brachte keine Konzentrationsänderung des Blutes zustande.

Mit den eben geschilderten Versuchen war mit aller Strenge bewiesen worden, daß Filtration für sich allein als Mittel zur Wasser- und Stoffwanderung im Organismus keine Rolle spielt. Bei der Kompliziertheit der Vorgänge im tierischen Organismus und angesichts des Umstandes, daß der Organismus über vielfache Mittel verfügt, um den Bedürfnissen gerecht zu werden, wird man vielleicht die Vorsicht nicht für übertrieben halten, den hier gelieferten Beweis zunächst nur für die Speicheldrüse gelten zu lassen. Es fragt sich, ob nicht die besonderen Bedingungen der Speicheldrüse das soeben festgestellte Verhalten erklären, aber nicht notwendigerweise Allgemeingültigkeit besitzen. Bei der Speicheldrüse liegen die Dinge so, daß sie in bezug auf ihre sekretorische Tätigkeit immer in Ruhe verharrt, außer wenn auf dem Wege der sekretorischen Nerven ihr Erregung zufließt. Wenngleich in den Versuchen von *Demoor* Andeutungen vorliegen, daß auf hormonalem Wege eine Speichelabsonderung ausgelöst werden kann, so scheint doch dieser Weg unter physiologischen Bedingungen kaum in Betracht zu kommen. Da dergestalt die Speicheldrüse nur wenn nervöse Impulse sie treffen zur Tätigkeit geweckt ist, könnte man sich vorstellen, daß sie vor dem Einfluß irgend eines anderen Faktors, der eventuell einen Austausch zwischen Blut und Gewebe veranlassen könne, geschützt sei. Demzufolge könnten besondere Vorrichtungen vorhanden sein, die an diesem Orte absolut verhinderten, daß Blutdruckschwankungen irgend einen Einfluß auf die Zusammensetzung des Blutes hätten. Es waren Erwägungen dieser Art, die es mir ratsam erscheinen ließen, auf Anregung von Prof. *Asher* mit den früher von ihm benutzten Methoden den etwaigen Einfluß von Blutdruckschwankungen auf Flüssigkeitswanderung zwischen Blut und Gewebe an anderen Orten zu prüfen.

Ich wählte zu meinen Versuchen zwei andere Gewebsgebiete, welche natürlich beide im Kopfgebiete liegen müssen, und zwar deshalb, weil die nach wie vor einzig reine Methode der Drucksteigerung durch

hohe Aortenkompression bei meinen Versuchen in Frage kam. Die beiden gewählten Gebiete waren einmal das Ohr des Kaninchens, das andere Mal die ganze Kopfregion einer Seite. Insoweit die Technik des Blutauffangens in den beiden Gebieten verschieden ist, will ich sie getrennt beschreiben. Da bei den Untersuchungen am Ohre so gut wie keine Eingriffe unternommen wurden, konnte das Tier ohne Narkose aufgebunden werden. Das zur Blutentnahme dienende Ohr wurde mit leichter Wärme durch Bestrahlung mit einer Glühlampe oder durch leichtes Massieren vorbehandelt, um in demselben einen guten Kreislauf zu erzielen. Nach mannigfachen Vorversuchen ergab sich als einfachste Methode der Blutentnahme der Stich in eine Randohrvene mit einer Nadel oder mit einer feinen, vorn sehr spitzen Lanzette. Bei richtiger Lagerung quillt ein ergiebig großer Tropfen, der mit der Pipette des *Sahli*schen Hämoglobinbestimmungsapparates aufgefangen werden kann. Um aus der Vena jugularis Blut abzufangen, wurde in bekannter Weise die Vena jugularis freigelegt. Um Blut aus derselben zu entnehmen, wurde die Kanüle einer feinen, genau kalibrierten Spritze in die Vena eingestoßen, um mit Hilfe der Spritze eine zur Hämoglobinbestimmung hinreichende Menge Blut aufzusaugen. Man lernt bald die Kanüle so einzustecken, daß sie ohne Stauung und ohne weitere Verletzung der Wand in dem Lumen der Vene liegt, und daß man sehr rasch die nötige Quantität Blut entziehen kann. Die von mir benutzte Spritze war eine solche, die speziell für sehr visköse Flüssigkeiten konstruiert wird. Um am gleichen Tiere mehrfache Versuche machen zu können, wird Blut aus der Vena jugularis der beiden Seiten entnommen. Gelegentlich kommt es vor, daß bei Anwendung des hohen Druckes hinterher die Blutstillung nicht ganz leicht ist; aber man kommt in den meisten Fällen mit einer leichten Kompression mit Gaze oder Watte zum Ziele. Jede irgendwie anhaltende Stauung in der Vene muß peinlich vermieden werden. Bei der Blutentnahme in beiden Gebieten verlief der Versuch so, daß zuerst bei Normaldruck eine Blutentnahme stattfand. Dann habe ich die hohe Aortenkompression ausgeführt, d. h. ich habe sie durch einen Gehilfen ausführen lassen, während ich mich ausschließlich um das korrekte Auffangen des Blutes bekümmerte. Die Aortenkompression fand in der Weise statt, daß die rechte Hand unter die linke Seite des Tieres gelegt wird, und zwar vier Finger der rechten Hand, während der Daumen der rechten Hand allmählich gegen die Wirbelsäule vordringt, um die links von der Wirbelsäule liegende Aorta abdominalis in Zwerchfellhöhe gegen die Wirbelsäule drückend abzuschließen. Bei kleinen Tieren ist diese Kompression sehr leicht; bei größeren Tieren tut man gelegentlich gut, auch die linke Hand zu Hilfe zu nehmen, indem man in der gleichen Weise die linke Hand unter die rechte Seite des

Tieres führt und den Daumen der linken Hand gleichfalls zur Kompression mit benutzt. Das Gelingen der richtigen Kompression merkt man sofort an den Ohrgefäßen des Kaninchens oder, wenn man eine Stelle der Halsregion freigelegt hat, an dem Verhalten und dem Pulsieren der Halsgefäße. Ich habe in einigen Fällen durch Registrierung des Druckes in einer Karotis die Blutdrucksteigerung durch Aortenkompression gemessen, die sich auf Beträge von 30 bis 60 mm Druckerhöhung belaufen können. Bei der Aortenkompression ist nur darauf zu achten, daß man weder die Leber verletzt, noch in die Region kommt, wo man etwa die Vena cava inferior in Mitleidenschaft zieht. In letzterem Falle gelingt die Drucksteigerung nicht, was man sofort schon durch bloße Beobachtung der Gefäße in der Kopfregion feststellen kann.

Um etwaige Konzentrationsunterschiede des Blutes nachzuweisen, die nach 1 bis 2 Minuten langer, manchmal 3 Minuten langer Aortenkompression nach der mechanischen Theorie hätten zustande kommen müssen, habe ich mich der Hämoglobinbestimmung mit Hilfe von *Sahlis* Hämoglobinometer bedient. Die Genauigkeit dieses bewährten Apparates ist von einer Größenordnung, die für die Zwecke meiner Versuche vollständig hinreicht. Ich habe, ehe ich die eigentlichen Versuche begann, mich längere Zeit eingeübt, um konstante Resultate mit der gleichen Blutprobe zu gewinnen, und habe im Verlauf meiner Versuche blinde Proben eingeschoben, um mich von der Genauigkeit der Methode immer wieder zu überzeugen. Als besonders vorteilhaft habe ich gefunden, nicht bloß jede einzelne aufgefangene Blutprobe mit der Standard-Kolorimeterflüssigkeit zu vergleichen, sondern ich habe auch die aus zwei verschiedenen Versuchsperioden gewonnene Blutmenge miteinander verglichen, d. h. diejenige Blutmenge, die bei Normaldruck, und die andere Blutmenge, die bei erhöhtem Blutdruck aufgefangen worden war. Auf diese Weise kommt das sogleich mitzuteilende Ergebnis außerordentlich klar zum Ausdruck.

Die Resultate meiner Versuche habe ich am Schluß der Arbeit tabellarisch zusammengestellt. Der Inhalt derselben läßt sich sehr kurz angeben. In allen Versuchen, sowohl in denjenigen am Ohre wie in denjenigen an der Vena jugularis, war der Hämoglobingehalt bei Entnahme während des normalen Blutdruckes wie bei Entnahme auf der Höhe des gesteigerten Blutdruckes genau der gleiche. Ich will zur Illustration ein beliebiges Beispiel herausgreifen. Um 3 Uhr 10 Min. wurde am mit Uretan narkotisierten Kaninchen — die Narkose fand statt, weil es ein Versuch war, in welchem manometrisch der Druck in der Karotis bestimmt wurde — Blut entnommen und der Hämoglobingehalt bestimmt. Derselbe betrug 64 Proz. Um 3 Uhr 30 Min. wurde, nachdem 120 Sekunden lang die Aorta komprimiert worden war und ebenso lange ein Blutdruck von 120 mm bestanden hatte,

wiederum Blut entnommen: der Hämoglobingehalt betrug genau wie vorher 64 Proz. Um 4 Uhr 5 Min. fand abermals 90 Sekunden lang die hohe Aortenabklemmung statt. Bei einem Blutdruck von 110 mm wird ein Hämoglobingehalt von 63 Proz. bestimmt. Genau wie dieser Versuch verliefen alle anderen gelungenen Versuche. Es zeigt sich, daß venöses Blut, welches bei einem niederen normalen Blutdruck, und solches, welches während eines stark gesteigerten Blutdruckes aufgefangen wird, keinen Konzentrationsunterschied aufweist. Da nachweislich in diesen Versuchen der Blutdruck gesteigert war, und zwar sowohl der arterielle wie auch der kapillare, da ferner das aufgefangene Blut bloß aus dem Gebiete stammte, in dem der gesteigerte Blutdruck zur Geltung kam und kein Blut sich zumischen konnte, welches aus einem anderen Gebiete stammt, bleibt nur der Schluß übrig, daß Steigerung des Blutdruckes für sich allein keinen Austritt von Plasmabestandteilen aus dem Blute zur Folge hat. Die Flüssigkeit, welche außerhalb der Blutkapillaren sich befindet, ist nicht durch Filtration entstanden. Der Erfolg meiner Versuchsreihen beruht darauf, daß keine andere Veränderung eingetreten ist als bloße mechanische Drucksteigerung: wenigstens gilt diese Behauptung für die Bedingungen meiner Versuche. Es bleibt eine Frage für sich, ob nicht bei andauernder hoher Aortenkompression Folgen eintreten, welche nicht bloß in mechanischer Steigerung des Blutdruckes bestehen, Folgen, die etwa darauf beruhen könnten, daß nervöse Reizungen durch den erhöhten Blutdruck gewisse, nicht mechanische Wirkungen auslösen. Bei der Dauer meiner Versuche sind dieselben nicht ins Spiel gekommen.

Meine Versuche erweitern die Erfahrung, die in den Arbeiten von *Asher* und von *Zimmermann* gemacht worden sind. Die Bedenken, welche ich oben geäußert habe, daß die Versuche an der Speicheldrüse nur eine richtige Antwort eben für dieses Organ geben könnten, aber nicht allgemein gültig seien, haben sich nicht als stichhaltig erwiesen, denn ich konnte an zwei neuen Gebieten, dem Gebiete des Ohres und der ganzen Kopfregion ebenfalls zeigen, daß unter dem Einfluß erhöhten Blutdruckes keine Flüssigkeit filtriert. Was das Ohr anlangt, so könnte man wiederum sich vorstellen, daß auch dieses Gebiet ein solches wäre, welches für Filtration wenig angepaßt sei, aber diese Vorstellung läßt sich wohl nur sehr schwer für das Quellgebiet der Vena jugularis aufrecht erhalten.

Zusammengefaßt ist das Ergebnis meiner Arbeit das nachfolgende:

Es konnte im Gebiete des Kaninchenohres und im ganzen Kopfgebiete des Kaninchens nachgewiesen werden, daß rein mechanische Steigerung des Blutdruckes auch nicht die geringste Konzentrierung des Blutes hervorruft, daß also Filtration nicht derjenige Faktor ist, welcher die Wasserwanderung von den Kapillaren zu den Geweben beherrscht.

Versuche zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Blutes bei Kaninchen.

1. Graues Kaninchen (2050 g).

26. und 28. Mai 1923. Bestimmung des Hämoglobingehaltes des Blutes unter normalen Verhältnissen an rechter und linker Ohrvene des Kaninchens.

Ort der Blutentnahme	Zeit	Hämoglobingehalt Proz.
Linkes Ohr . . .	26. V. 9h 45′	71
Rechtes Ohr . . .	26. V. 11	72
Linkes Ohr . . .	28. V. 3 20	71
Rechtes Ohr . . .	28. V. 3 25	70

Durchschnittszahl = 71 Proz.

Am 29. Mai, 10h 30′, betrug der Hämoglobingehalt des venösen Blutes, der Ohrvene entnommen, **74 Proz.**

10h 39′ *Aortenkompression* während 2 Minuten; während der Dauer der Kompression betrug die *Hämoglobinmenge* ebenfalls **74 Proz.**

11h 15′ wiederholte Hämoglobinbestimmung unter *Normaldruck*, Ergebnis **78 Proz.**

11h 25′ wiederholte *Aortenkompression* während 80 Sekunden. Hämoglobingehalt während der Kompression **75 Proz.**

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt Proz.
Linkes Ohr . .	10h 30′	Blutentnahme unter normalen Verhältnissen	74
Rechtes Ohr .	10 39	Aortenkompression während 120 Sekunden	74
Linkes Ohr . .	11 15	Blutentzug unter Normaldruck	73
Rechtes Ohr .	11 25	Aortenkompression während 80 Sekunden	75

1. Graues Kaninchen (2050 g).

1. Juni 1923. 11h 5′. Das Tier wird mit 10,5 ccm 20proz. Uretanlösung narkotisiert (Subkutaninjektion). Blutentnahme aus der Vena jugularis mittels einer Spritze.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt Proz.
Vena jugularis rechts	11h 47′	Blutentnahme unter normalen Verhältnissen	65
	11 58	Aortenkompression während 85 Sekunden	65
	3	Blutentnahme unter normalem Blutdruck (95 mm)	67
	3 12	Aortenkompression während 100 Sek., Blutdruck 135 mm	67
	3 55	Blutentnahme unter normalen Verhältnissen	67

2. Graues Kaninchen (2140 g).

25. und 28. Mai 1923. Hämoglobinbestimmung unter Normaldruck.

Ort der Blutentnahme	Zeit	Hämoglobingehalt in Proz.
Linkes Ohr . . .	26. V. $10^{h}23'$	76
Rechtes Ohr . .	26. V. 11 50	73
Linkes Ohr . . .	28. V. 3 50	73
Rechtes Ohr . .	28. V. 4	70

Durchschnittszahl = 73 Proz.

29. Mai. Hämoglobinbestimmung unter Normaldruck und unter Aortenkompression.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt in Proz.
Linkes Ohr . .	$3^{h}20'$	Blutentnahme unter Normaldruck	74
Rechtes Ohr .	3 47	Aortenkompression während 80 Sekunden	75
Linkes Ohr . .	4 40	Blutentnahme unter Normaldruck	75
Rechtes Ohr .	5 10	Aortenkompression während 90 Sekunden	73

Durchschnittszahl = 74 Proz.

5. Juni. Das Tier wird mit 10,7 ccm 20proz. Uretanlösung subkutan injiziert. Durchtrennung der beiden Halssympathicus. Blutentnahme aus der Vena jugularis mittels einer Spritze.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt in Proz.
Vena jugularis rechts	$3^{h}20'$	Blutentnahme unter normalem Blutdruck (85 mm)	66
	3 45	Aortenverschluß während 70 Sekunden, Blutdruck 104 mm	66
	4 05	Blutentnahme unter Normaldruck	61
	4 20	Aortenkompression während 70 Sekund., Drucksteigerung 70 mm	61

3. Kleines schwarzes Kaninchen (1080 g).

28. Mai 1923. Blutentnahme unter normalen Verhältnissen zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt in Proz.
Linkes Ohr . .	$8^{h}35'$	Blutentzug unter Normaldruck	75
Rechtes Ohr .	8 50	„ „ „	78
Linkes Ohr . .	1 40	„ „ „	73
Rechtes Ohr .	1 55	„ „ „	74

Durchschnittszahl = 75 Proz.

30. Mai. Blutentnahme unter Aortenkompression. Bestimmung des Hämoglobingehaltes.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt Proz.
Ohr	9h 30′	Blutentnahme unter normalen Verhältnissen	74
Ohr	10 20	Aortenkompression während 80 Sekunden	74

4. Kleines schwarzes Kaninchen (1170 g).

28. Mai. Hämoglobinbestimmung unter normalen Verhältnissen.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt Proz.
Linkes Ohr . .	9h 10′	Blutentzug unter Normaldruck	80
Rechtes Ohr .	9 40	„ „ „	76
Linkes Ohr . .	2 15	„ „ „	74
Rechtes Ohr .	2 30	„ „ „	71

Durchschnittszahl = 75 Proz.

30. Mai. Blutentnahme unter Aortenkompression und Bestimmung des Hämoglobingehaltes.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt Proz.
Ohr	2h 20′	Blutentzug unter Normaldruck	74
Ohr	2 30	Aortenkompression während 70 Sekunden	76

also keine Veränderung des Hämoglobingehaltes.

5. Weißes Kaninchen (1700 g).

19. Juni 1923. Das Kaninchen wurde um 2h 30′ mit 8,5 ccm 20proz. Uretanlösung narkotisiert (Subkutaninjektion). Blutentnahme aus der Vena jugularis mittels einer Spritze.

Ort der Blutentnahme	Zeit		Hämoglobingehalt Proz.
Vena jugularis	3h 10′	Blutentnahme unter normalen Verhältnissen, Blutdruck 90 mm	64
Vena jugularis	3 30	Aortenkompression während 120 Sek., Blutdruck 120 mm	64
Vena jugularis	4 5	Aortenkompression während 90 Sek., Blutdruck 110 mm	63

Blutdrucksteigerung bewirkt also keine Veränderung im Hämoglobingehalt.

Untersuchungen über den Einfluß der sympathischen Innervation auf die Permeabilität der Gefäße.

Von

J. Yamamoto.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1923.)

In einer vorausgegangenen Arbeit hat *Kajikawa*[1]) die Frage experimentell in Angriff genommen, ob die Nerven, speziell die sympathischen Nerven, einen Einfluß auf die Permeabilität der Gefäße haben. Die sympathischen Nerven empfahlen sich in erster Linie für diese Art der Untersuchung, weil bei diesen eine Ausschaltung der Nerven möglich ist, ohne daß grob erkennbare Funktionsausfälle der von diesen Nerven innervierten Organe eintreten, wie dies der Fall sein würde, wenn man Nerven zu den willkürlichen Muskeln durchtrennt. *Kajikawa* wählte als Untersuchungsgebiet, um den etwaigen Einfluß des Sympathicus auf die Permeabilität der Gefäße zu prüfen, die vordere Kammer des Kaninchenauges. Dies geschah aus folgenden Gründen:

1. läßt sich der dieses Gebiet versorgende sympathische Nerv weit von der eigentlichen Untersuchungsstelle durchschneiden, so daß keine Gefahr besteht, durch die unmittelbaren Folgen der Operation die Ergebnisse zu trüben;
2. ist das vordere Kammerwasser leicht zugänglich und steht in einer mehr oder weniger unmittelbaren Beziehung zu den benachbarten Gefäßen, wobei natürlich nicht behauptet werden soll, daß spezifische Zellen keinen Einfluß auf die Bildung des Kammerwassers haben. So viel ist aber jedenfalls sicher, daß die Permeabilität der Gefäße in jenem Vorgang, der das vordere Kammerwasser betrifft, mit eingehen muß;

[1]) *J. Kajikawa*, diese Zeitschr. **138**, 391, 1922.

3. ließen sich Methoden finden, um die von der Permeabilität der Gefäße abhängigen Eigenschaften des Kammerwassers mehr oder weniger leicht zu untersuchen;
4. ist der Vergleich zwischen der normalen und der nicht normalen Seite bei der Paarigkeit des untersuchten Organs am gleichen Tiere jederzeit möglich;
5. läßt sich die Untersuchung am praktisch unversehrten Tiere ausführen;
6. läßt sich das gleiche Tier wiederholt zu den Versuchen benutzen.

Kajikawa stellte drei Reihen von Untersuchungen an. Von diesen drei Versuchsreihen mögen hier nur diejenigen zwei kurz rekapituliert werden, deren Ergebnisse ganz besonders schlagende waren. Die eine Reihe, die hier ins Auge gefaßt wird, war diejenige, wo *Kajikawa* Fluorescein in die Bauchhöhle injizierte und die Zeit untersuchte, die verging, bis das Fluorescein in der vorderen Kammer auftrat. In dieser Versuchsreihe ergab sich, daß auf derjenigen Seite, wo der Nervus sympathicus fehlte, das Fluorescein später in der vorderen Kammer auftrat. Dieses Ergebnis läßt die Deutung zu, daß unter dem Einfluß der Abwesenheit des Nervus sympathicus die Permeabilität der Gefäße für den Farbstoff viel geringer geworden ist als auf der normal innervierten Seite.

Die andere Versuchsreihe *Kajikawas* bestand darin, daß er nach Punktion der vorderen Kammer den Wiederersatz des vorderen Kammerwassers untersuchte, und zwar bestimmte er den Eiweißgehalt des neu gebildeten Kammerwassers mit Hilfe der refraktometrischen Methode. In dieser Versuchsreihe ergab sich, daß das neu gebildete Kammerwasser auf derjenigen Seite ärmer an Eiweißkörpern war, wo der Nervus sympathicus samt dem Ganglion cervicale superius exstirpiert worden war. Auch dieses Ergebnis liegt in der gleichen Richtung wie das voraufgegangene, denn es besagt, daß auf der Seite ohne Sympathicus die Durchlässigkeit für Eiweiß geringer ist als auf der normalen Seite.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse waren durchaus regelmäßiger Natur. Sie entsprachen nicht den Erwartungen, die man von vornherein haben konnte. Denn da der Sympathicus nach allem, was wir bisher wissen, vasokonstriktorische Nerven für die Gefäße des Auges enthält, die Fortnahme desselben also zu einer Gefäßerweiterung führt, war es zunächst nicht unwahrscheinlich, daß infolge hiervon die Permeabilität der Gefäße größer sei.

Die Befunde von *Kajikawa* regten dazu an, den etwaigen Einfluß sympathischer Nerven auf die Permeabilität der Gefäße in anderen Gebieten und mit einer teilweise anderen Methodik zu untersuchen. Schon deshalb hat diese erneute Untersuchung ein Interesse, weil die

von *Kajikawa* gemachten Beobachtungen zum erstenmal seit langer Zeit vom Standpunkte der reinen Physiologie einen trophischen Einfluß von Nerven wieder in Diskussion zu stellen gestatten. Ich habe daher auf Anregung von Prof. *Asher* neue Untersuchungen über den Einfluß des Sympathicus auf die Gefäßpermeabilität in zwei Gegenden angestellt, einmal an dem Ohre des Kaninchens, und das andere Mal an den Muskeln des Halses bzw. an dem subkutanen Gewebe der Halsgegend. Diese Gegenden wurden wiederum gewählt, weil sie Innervationsgebiete des leicht zugänglichen Halssympathicus sind, und weil die Durchschneidung des Sympathicus in diesen beiden Gegenden keine grob erkennbaren Störungen ihrer Funktion setzt.

Die erste Methode, welche ich angewandt habe (sie ist nicht die zeitlich erste gewesen, aber sie ist ihrem Wesen nach die einfachste, weshalb ich sie an erster Stelle mitteilen will), war die Erzeugung einer kleiner Quaddel am Ohr und die Feststellung der Zeit des Verschwindens dieser Quaddel. Auf der einen Seite war vorher der Sympathicus durchschnitten und weitgehend reseziert worden. Ich habe in allen Fällen die Operation auf der linken Seite ausgeführt, und zwar wie in der üblichen Weise unter Innehaltung der aseptischen Kautelen. Ich injizierte stets genau 1 ccm einer sterilen 1proz. Kochsalzlösung unter die Haut des Ohres, was eine sehr deutlich sichtbare Quaddel ergab. Die Änderungen in der Größe der Quaddel bis zu deren vollständigem Verschwinden ließen sich leicht mit bloßem Auge verfolgen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe waren durchaus eindeutiger Natur. Ich habe die Resultate an vier Kaninchen gewonnen und habe in Tabelle I alles Wissenswerte mitgeteilt. Hier finden sich die Beobachtungen nach 30 Minuten und nach 1 Stunde nach der Injektion. + bedeutet, daß die Quaddel noch vorhanden ist, — bedeutet, daß sie verschwunden ist. Ausnahmslos zeigt sich in allen Versuchen, daß nach 1 Stunde die Quaddel auf der normalen Seite noch vorhanden ist, während sie auf der sympathicuslosen Seite verschwunden ist. Dies läßt sich nur so deuten, daß die Resorption auf der sympathicuslosen Seite rascher vor sich geht, und daraus ließe sich weiter folgern, daß auch die Permeabilität eine größere sei. Das raschere Verschwinden der experimentell erzeugten Quaddel auf der sympathicuslosen Seite erscheint als eine ganz natürliche Folge der nach Sympathicusdurchschneidung eintretenden Gefäßerweiterung. Denn da in der Zeiteinheit auf der Seite mit erweiterten Gefäßen unter den obwaltenden Bedingungen ein beschleunigter Blutstrom kreist, ist damit auch eine raschere Abfuhr der Injektionsflüssigkeit gegeben. Aber dieses raschere Verschwinden der Quaddelflüssigkeit findet auch noch viele Wochen nach der Durchschneidung des Sympathicus statt, wenn die Erweiterung, die anfänglich sehr stark ausgeprägt war, wieder zurückgegangen ist. Es hängt also das raschere Verschwinden der Quaddelflüssigkeit nicht zwangsläufig mit der Erweiterung der Gefäße, sondern mit dem Fehlen der sympathischen Innervation zusammen. Demnach würde diese Versuchsreihe zeigen, daß infolge der Durchschneidung des Nervus sympathicus die Gefäße des Ohrgebietes, soweit die Prüfung vermittelst Resorption aus einer künstlich erzeugten Quaddel einen Schluß zuläßt, eine größere Permeabilität besitzen als im normalen Zustande.

Eine nächste Versuchsreihe bestand darin, daß ich intramuskulär in die Muskeln des Halses Farbstoff, und zwar Indigcarmin, injizierte und die

Zeit verfolgte, die verstrich, bis der Farbstoff zuerst im Harn auftrat. Um das Halsmuskelgebiet frei von den Einflüssen der sympathischen Innervation zu machen, habe ich den gesamten Sympathicus auf der linken Seite samt den dazu gehörigen Ganglien exstirpiert. Ich verfuhr hierbei auf die Weise, daß ich nach einem Hautschnitt in der ganzen Länge des Halses stumpf und schonend den Sympathicus freilegte und zunächst bis zum Thoraxeingang verfolgte, um das Ganglion cervicale inferius mit allen seinen Fortsätzen zu präparieren. Peripheriewärts von dem Ganglion legte ich einen Faden an, exstirpierte dann das Ganglion, verfolgte den Sympathicus nach oben bis zum Ganglion cervicale sup. und entfernte das ganze Stück, bestehend aus den beiden Ganglien und dem Halssympathicus.

Die Versuche wurden erst angestellt, nachdem vollständige Heilung von dem Eingriffe eingetreten war. Auch diese Versuche wurden an vier Kaninchen angestellt. Zur Untersuchung wurde das Kaninchen auf das Kaninchenbrett festgebunden und ein Katheter in die Blase eingeführt, um den Harn aufzufangen. Um konstante Temperaturbedingungen aufrecht zu erhalten, wurde mit Glühlampen das Tier warm erhalten. Zur Injektion diente eine 0,4proz. Indigcarminlösung in 0,95proz. Kochsalzlösung. Die vergleichenden Versuche konnten natürlich nicht am gleichen Tage angestellt werden, vielmehr mußte einen Tag die normale Seite, den anderen Tag die entnervte Seite zur Injektion dienen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe finden sich in Tabellen II bis V.

Tabelle I.

Vergleich über die Dauer bis die Quaddel verschwindet.

	1. Kaninchen		3. Kaninchen		4. Kaninchen		5. Kaninchen	
1proz. Kochsalzlösung der Injektionsmenge . . .	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm
Seite	rechts (norm.)	links (oper.)	rechts (norm.)	links (oper.)	rechts (norm.)	links (oper.)	rechts (norm.)	links (oper.)
30 Min. n. Injektion	(+)	(±)	(+)	(±)	(+)	(—)	(+)	(—)
1 Std. n. Injektion	(+)	(—)	(+)	(—)	(+)	(—)	(+)	(—

Tabelle II.

1. Kaninchen (weiblich). Operation am 10. Januar 1923.

	Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum		Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum
Erstes Auftreten des Farbstoffes nach Injektion	45′	12. I.	45′	13. I.	Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn	2h	12. I.	2h	13. I.
	45	15. I.	40	16. I.		3	9. II.	5 10′	16. I.
	25	9. II.	15	6. II.		5 10′	16. II.	6	22. II.
	30	5. III.	20	3. III.		4 5	5. III.	6 30	3. III.
	50	7. III.	40	13. III.		5 5	7. III.	6 5	13. III.
Durchschnitt	39′		34′		Durchschnitt	3h52′		5h9′	

Vergleichende Untersuchung des ersten Auftretens und Gesamtdauer der Ausscheidung von Farbstoff in dem Harn, z. B. Indigcarmin (0,4 Proz. Indigcarmin in 0,95proz. NaCl-Lösung).

Tabelle III. 3. Kaninchen (männlich). Operation am 26. Januar 1923.

	Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum		Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum
Erstes Auftreten des Farbstoffes nach Injektion	30′	29. I.	25′	2. II.	Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn	5h	29. I.	6h15′	2. II.
	30	5. II.	20	7. II.		3 20′	5. II.	5 10	7. II.
	25	10. II.	25	19. II.		3 30	10. II.	6 45	19. II.
	45	24. II.	25	1. III.		4 15	24. II.	5 20	1. III.
	25	27. IV.	20	6. III.		5	27. IV.	9 10	6. III.
Durchschnitt	27′		23′		Durchschnitt	4h13′		6h32′	

Vergleichende Untersuchung des ersten Auftretens und Gesamtdauer der Ausscheidung von Farbstoff im Harn, z. B. Indigcarmin (0,4 Proz. Indigcarmin in 0,95proz. NaCl-Lösung).

Tabelle IV. 4. Kaninchen (männlich). Operation am 15. Februar 1923.

	Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum		Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum
Erstes Auftreten des Farbstoffes nach Injektion	30′	12. III.	25′	9. III.	Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn	6h25′	12. III.	8h	9. III.
	25	20. III.	25	15. III.		6 25	20. III.	7 15′	15. III.
	25	17. IV.	15	19. III.		5 40	17. III.	7 45	19. III.
	20	21. IV.	15	26. IV.					
	20	28. IV.	15	30. IV.					
Durchschnitt	24′		19′		Durchschnitt	6h10′		7h40′	

Vergleichende Untersuchung des ersten Auftretens und Gesamtdauer der Ausscheidung von Farbstoff im Harn, z. B. Indigcarmin (0,4 Proz. Indigcarmin in 0,95proz. NaCl-Lösung).

Tabelle V. 5. Kaninchen (männlich). Operation am 8. März 1923.

	Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum		Normalseite (rechts)	Datum	Operationsseite (links)	Datum
Erstes Auftreten des Farbstoffes nach Injektion	50′	14. III.	30′	19. III.	Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn	5h25′	14. III.	8h5′	19. III.
	30	20. III.	20	20. IV.		5 45	20. III.	7	20. IV.
	40	21. IV.	15	24. IV.					
	20	23. IV.	15	26. IV.					
Durchschnitt	35′		20′		Durchschnitt	5h35′		7h32,5′	

Vergleichende Untersuchung des ersten Auftretens und Gesamtdauer der Ausscheidung von Farbstoff im Harn, z. B. Indigcarmin (0,4 Proz. Indigcarmin in 0,95proz. NaCl-Lösung).

Was das erste Auftreten des Farbstoffes nach der Injektion anbetrifft, so zeigte sich ausnahmslos in allen Versuchen, daß der Farbstoff am frühesten im Harn erschien, wenn die Injektionsseite die operierte, also die sympathicuslose Seite war. Im einzelnen betrugen die Unterschiede 39 und 34, 27 und 23, 24 und 19, 35 und 20 Minuten.

Aus dieser Versuchsreihe ergibt sich daher, daß die Resorption aus den Muskeln auf derjenigen Seite, wo die sympathische Innervation fehlt, die raschere ist, und hieraus läßt sich wiederum der Schluß ziehen, daß die Permeabilität der Gefäße auf der entnervten Seite eine größere als auf der normalen Seite sei. Jedenfalls ist die Permeabilität nicht eine kleinere. Es bleibt noch, wenn man überaus vorsichtig sein will, die Möglichkeit der Annahme, daß infolge des beschleunigten Blutstromes auf der entnervten Seite eine raschere intramuskuläre Resorption zustande gekommen sei.

Ich habe auch die Gesamtdauer der Ausscheidung von Farbstoff in den Harn vergleichend untersucht. Dabei stellte sich nun das merkwürdige Resultat heraus, daß, wenn ich auf der entnervten Seite die intramuskuläre Injektion des Farbstoffes ausgeführt hatte, die Dauer der Ausscheidung des Farbstoffes im Harn sehr viel länger war, als wenn die Injektion auf der unversehrten Seite stattgefunden hatte. Die durchschnittlichen Unterschiede sind die nachfolgenden: 3 Stunden 52 Minuten, 5 Stunden 9 Minuten; 4 Stunden 13 Minuten, 6 Stunden 32 Minuten; 6 Stunden 10 Minuten, 7 Stunden 40 Minuten; 5 Stunden 35 Minuten, 7 Stunden 32 Minuten. Die Unterschiede in den einzelnen Versuchsreihen sind so groß, daß es sich nicht um zufällige kleine Variationen handeln kann. Dem Umstande entsprechend, daß der Farbstoff nach Injektion auf der entnervten Seite so viel rascher auftritt, würde es entsprochen haben, daß auch die Resorption früher abgeklungen wäre. Dem ist nun ganz und gar nicht so. Hier läge ein Anhaltspunkt für die Annahme einer verzögerten Resorption, demnach einer verminderten Permeabilität vor. Der Farbstoff läßt vielleicht die rein physiologische Komponente schärfer hervortreten.

Eine weitere Versuchsreihe bestand darin, daß ich 50 ccm einer 2proz. Kochsalzlösung gleichzeitig sowohl auf der normalen als auch auf der entnervten Seite intramuskulär injizierte. Ich entnahm dann stundenweise in der ersten bis vierten Stunde nach der Injektion eine Probe der injizierten Flüssigkeit, um die Änderung des Chlorgehaltes nach der Mikromethode von *Bang* zu bestimmen. Ich habe die Ergebnisse dieser Versuchsreihe in den Tabellen VI bis IX niedergelegt. Es zeigte sich, daß in den ersten Stunden nach der Injektion durchschnittlich der Chlorgehalt auf der entnervten Seite rascher abnahm als auf der unversehrten Seite, wenn auch die Unterschiede keine allzu großen waren. Auch aus diesen Versuchsdaten ergibt sich daher, daß auf der sympathicuslosen Seite die Resorption von Kochsalz eine raschere als auf der unversehrten Seite ist. In der dritten und vierten Stunde nach der Injektion kehrte sich häufig das Verhältnis um, indem eine weitere Abnahme des Chlorgehaltes auf der unversehrten Seite zu beobachten war, nicht hingegen auf der entnervten Seite. Da ins-

gesamt diese Versuchsreihe keine eindeutigen Resultate lieferte, habe ich die Versuche abgeändert und von 10 zu 10 Minuten nach Injektion einer 2proz. Kochsalzlösung eine kleine Probe des künstlichen Ödems zur Chlorbestimmung nach *Bang* entnommen. (Tabelle X.) In dieser Versuchsreihe ergab sich mit größerer Deutlichkeit, daß im Verlaufe der ersten Stunde die Kochsalzresorption auf der entnervten Seite eine größere war als auf der unversehrten Seite. Demnach ergibt auch diese Versuchsreihe keinen Anhaltspunkt für eine verminderte Permeabilität der Gefäße, vielmehr für eine größere Permeabilität auf der entnervten Seite, wenn man sich nicht beschränken will auf die Annahme einer rascheren Resorption infolge eines geschwinderen Kreislaufs auf der entnervten Seite.

Tabelle VI. 1. Kaninchen (weiblich). Operation am 10. Januar 1923.
Chlorbestimmung nach *Bang* (2proz. Kochsalzlösung 50 ccm).
Normale Seite (rechts). Operierte Seite (links).

Zeit nach Injektion	Datum 14. II. Proz.	19. II. Proz.	26. II. Proz.	25. IV. Proz.	Durchschnitt Proz.	Zeit nach Injektion	Datum 14. II. Proz.	19. II. Proz.	26. II. Proz.	25. IV. Proz.	Durchschnitt Proz.
1 Std.	1,8081	1,2829	0,8723	0,9236	1,2217	1 Std.	1,1851	1,0428	0,9088	0,7956	0,9831
2 „	1,1282	1,1137	0,855	0,8043	0,9753	2 „	0,9587	1,0579	0,8815	0,7242	0,9055
3 „	0,8463	0,9767	0,8090	0,7665	0,8496	3 „	0,8602	1,0029	0,7990	0,7208	0,8457
4 „		0,7570	0,7844	0,7060	0,7491	4 „		0,9040	0,7445	0,7020	0,7835

Vergleich der Temperatur (in den Ohren). Vergleich der Gefäßweite (in den Ohren).

Kaninchen	Temperatur rechtes Ohr (norm.) °C	linkes Ohr (oper.) °C	Datum	Differenzwärmegrad °C	Kaninchen	Gefäßweite rechtes Ohr (norm.) mm	linkes Ohr (oper.) mm	Datum	Differenz der Weite mm
1. Kaninchen	36,6	38,2	1923 7.III.	1,6	1. Kaninchen	0,5	1	12.III.	0,5
3. „	37	38,4	7.III.	1,4	3. „	0,6	1	12.III.	0,4
4. „	37,4	39,4	7.III.	2	4. „	1,0	2	12.III.	1,0
5. „	36,4	38,4	10.III.	2	5. „	1,0	1,5	12.III.	0,5
Durchschn.	36,85	38,6		1,75	Durchschn.	0,77	1,37		0,6

Tabelle VII. 3. Kaninchen (männlich). Operation am 26. Januar 1923.
Chlorbestimmung nach *Bang* (2proz. NaCl-Lösung, 50 ccm).
· Normale Seite (rechts). Entnervte Seite (links).

Zeit nach Injektion	Datum 16. II. Proz.	22. II. Proz.	27. II. Proz.	23. IV. Proz.	Durchschnitt Proz.	Zeit nach Injektion	Datum 16. II. Proz.	22. II. Proz.	27. II. Proz.	23. IV. Proz.	Durchschnitt Proz.
1 Std.	1,2469	1,1521	0,9251	0,8775	1,0504	1 Std.	1,0603	0,9945	0,87	0,8635	0,9470
2 „	0,8775	1,1084	0,8043	0,7711	0,8903	2 „	1,3988	0,9225	0,8088	0,8005	0,9826
3 „	0,765	0,9354	0,8537	0,78	0,8335	3 „	1,0075	0,9040	0,8582	0,8902	0,9149
4 „	0,5318	0,8954	0,78	0,663	0,7175	4 „	0,8125	0,8979	0,8357	0,7121	0,8145

Tabelle VIII.

4. Kaninchen (männlich). Operation am 15. Februar 1923.

Chlorbestimmung nach *Bang* (2proz. NaCl-Lösung, 50 ccm).

Normale Seite (rechts). Entnervte Seite (links).

Zeit nach Injektion	Datum			Durchschnitt	Zeit nach Injektion	Datum			Durchschnitt
	2. III.	21. III.	20. IV.			2. III.	21. III.	20. IV.	
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.		Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
1 Std.	1,1097	0,78	0,8934	0,9277	1 Std.	1,0356	0,8230	0,8397	0,8994
2 „	0,8580	0,78	0,819	0,819	2 „	1,053	0,8107	0,7683	0,8740
3 „	0,7037	0,7312	0,7098	0,7149	3 „	0,9119	0,8695	0,738	0,8398
4 „	0,5954	0,5052	0,7081	0,6029	4 „	0,8229	0,7060	0,7521	0,7603

Tabelle IX.

5. Kaninchen (männlich). Operation am 8. März 1923.

Chlorbestimmung nach *Bang* (2proz. Kochsalzlösung, 50 ccm).

Normale Seite (rechts). Entnervte Seite (links).

Zeit nach Injektion	Datum			Durchschnitt	Zeit nach Injektion	Datum			Durchschnitt
	22. III.	18. IV.	27. IV.			22. III.	18. IV.	27. IV.	
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.		Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
1 Std.	1,0739	1,3837	0,8165	1,0913	1 Std.	0,8540	1,1057	0,715	0,8915
2 „	0,9033	1,0379	0,6435	0,8615	2 „	0,8736	0,9306	0,6358	0,8133
3 „	0,8021	0,9029	0,6187	0,7745	3 „	0,7272	0,8462	0,6736	0,7490
4 „	0,7135	0,9018	0,5223	0,7125	4 „	0,6953	0,8609	0,6079	0,7213

Tabelle X.

Chlorbestimmung nach *Bang* (2proz. NaCl-Lösung, 50 ccm).

Normale Seite (rechts). Entnervte Seite (links).

Zeit nach Injektion	1. Kanin.	3. Kanin.	4. Kanin.	5. Kanin.	Durchschnitt	Zeit nach Injektion	1. Kanin.	3. Kanin.	4. Kanin.	5. Kanin.	Durchschnitt
	Datum						Datum				
	9. V.	7. V.	14. V.	11. V.			9. V.	7. V.	14. V.	11. V.	
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.		Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
10 Min.	0,8897	0,8957	0,8570	0,9518	0,8985	10 Min.	0,8775	0,8251	0,8011	0,9161	0,8549
20 „	0,87	0,8573	0,8450	0,9236	0,8739	20 „	0,7235	0,7538	0,7578	0,8621	0,7743
30 „	0,75	0,7845	0,8063	0,8214	0,7905	30 „	0,7081	0,7453	0,7762	0,8376	0,7668
40 „	0,6465	0,7032	0,7126	0,793	0,7139	40 „	0,6441	0,6349	0,702	0,78	0,6902
50 „	0,6627	0.6134	0,6997	0,7914	6,6918	50 „	0,6014	0,6305	0,6420	0,7521	0,6565

Da alle meine Versuche ein anderes Resultat ergeben hatten als die Versuche von *Kajikawa*, beschloß ich, seine Versuche nochmals in einer Kombination mit meiner Versuchsanordnung nachzuprüfen. Zu diesem Zwecke habe ich in einer Versuchsreihe auf der unversehrten Seite subkutan 5proz. Fluoresceinnatriumlösung, und zwar 5 ccm, injiziert. In der anderen Versuchsreihe habe ich die gleiche Injektion

in der entnervten Halsgegend ausgeführt. Als Reaktion wählte ich wie *Kajikawa* den Farbstoffeintritt in die vordere Kammer. Vor der Untersuchung habe ich aus beiden vorderen Kammern mit einer genau kalibrierten Spritze je 0,2 ccm Kammerwasser entnommen, um unter genau gleichen Voraussetzungen die Beobachtungen anzustellen. Da auf der einen Seite auch die Innervation für die Gefäße der vorderen Kammer fehlten, lagen die gleichen Bedingungen vor, wie in *Kajikawas* Versuchen. Und nun stellte sich tatsächlich heraus, daß in jedem Falle bei dem Vergleiche der beiden Augen der Farbstoffeintritt in die vordere Kammer später auf der entnervten Seite als auf der normalen Seite auftrat. Ich habe also die von *Kajikawa* gefundene Tatsache, daß in den Gefäßen des Auges nach Entfernung der Innervation eine verminderte Permeabilität besteht, vollinhaltlich bestätigen können. Andererseits trat der von mir gefundene Unterschied entgegengesetzter Natur, daß auf der entnervten Seite die Resorptionsgeschwindigkeit größer ist als auf der normalen, wiederum klar zutage. Denn es zeigte sich als Durchschnitt meiner Versuchsreihe, daß, wenn ich auf der entnervten Halsseite injizierte, nach 2 Minuten 41 Sekunden bzw. nach 4 Minuten 29 Sekunden der Farbstoff in die beiden vorderen Kammern eingetreten war, während nach Injektion auf der unversehrten Seite der Farbstoff nach 5 Minuten 30 Sekunden bzw. 6 Minuten 2,5 Sekunden in den vorderen Kammern beobachtet werden konnte (Tabelle XI).

Tabelle XI.

Versuche mit 5proz. Fluoresceinnatriumlösung, 5 ccm (Subkutaninjektion)

In rechte Halsgegend injiziert: In linke Halsgegend injiziert:

Kaninchen	Rechtes Auge (Normalseite)	Linkes Auge (Operat.-seite)	Datum	Kaninchen	Rechtes Auge (Normalseite)	Linkes Auge (Operat.-seite)	Datum
1. Kaninchen	5′ 15″	5′ 25″	24. V.	1. Kaninchen	3′	5′ 10″	28. V.
3. "	5 10	5 30	28. V.	3. "	3 15″	4 33	1. IV.
4. "	5	5 15	28. V.	4. "	2 40	3 30	1. IV.
5. "	6 35	8	28. V.	5. "	2 50	4 46	6. IV.
Durchschn.	5′ 30″	6′ 25″		Durchschn.	2′ 41″	4′ 29″	

Ich habe 0,2 ccm Kammerwasser aus der vorderen Kammer vor der Untersuchung abgesaugt, dann die Lösung injiziert.

Ich habe schließlich noch eine Versuchsreihe angestellt, in welcher ich die Reizbarkeit der Haut der beiden Ohren, wovon das eine entnervt war, durch Bepinselung mit Senföllösungen oder mit Xylollösungen geprüft habe. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe führten aber nicht zur Erkenntnis eines merklichen Unterschiedes der Empfindlichkeit der Haut auf beiden Seiten (Tabelle XII).

Tabelle XII.

Mittel		1. Kaninchen Normalseite (rechts)	1. Kaninchen Operat.-seite (links)	3. Kaninchen Normalseite (rechts)	3. Kaninchen Operat.-seite (links)	4. Kaninchen Normalseite (rechts)	4. Kaninchen Operat.-seite (links)	5. Kaninchen Normalseite (rechts)	5. Kaninchen Operat.-seite (links)
Physiologische Kochsalzlösung	Endzündl. Grad	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
	Datum	8. III. 1923	8. III. 1923	8. III. 1923	8. III. 1923	8. III. 1923	8. III. 1923	13. III. 1923	13. III. 1923
1proz. Senföl . .	Endzündl. Grad	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
	Datum	9. III. 1923	9. III. 1923	9. III. 1923	9. III. 1923	9. III. 1923	9. III. 1923	12. III. 1923	12. III. 1923
3proz. Senföl . .	Endzündl. Grad	(+)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)
	Datum	1. V. 1923	1. V. 1923	20. III. 1923	20. III. 1923	20. III. 1923	20. III. 1923	24. III. 1923	24. III. 1923
50proz. Xylololivöl	Endzündl. Grad	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
	Datum	13. III. 1923	13. III. 1923	13. III. 1923	13. III. 1923	13. III. 1923	13. III. 1923	23 III. 1923	23. III. 1923
Xylol purum . .	Endzündl. Grad	(+)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)
	Datum	30. IV. 1923	30. IV 1923	20. IV. 1923	20. IV. 1923	20. IV. 1923	20. IV. 1923	20. IV. 1923	20. IV. 1923

Vergleich der Hautreizbarkeit; beide Ohren sind gleich geblieben. Ich bediente mich verschiedener Mittel als Hautreizmittel. Die Größe der entfetteten Watte ist 25 mm lang und 15 mm weit. Die arzneimittelhaltige Watte wird 5 Minuten auf dem Ohr gelassen.

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse meiner Arbeit die folgenden:

1. Eine künstlich erzeugte Quaddel verschwindet auf dem Ohre eines Kaninchens auf der entnervten Seite früher als auf der unversehrten Seite.

2. Intramuskulär injiziertes Indigcarmin erscheint früher im Harn, wenn die Injektion in die Muskeln eines Gebietes stattgefunden hat, wo die sympathische Innervation fehlt.

3. Ein experimentelles Ödem, erzeugt durch subkutane Injektion von 2proz. Kochsalzlösung, nimmt rascher auf derjenigen Seite ab, wo die sympathische Innervation entfernt worden ist.

4. Die Hautreizbarkeit ist auf der unversehrten und der sympathicuslosen Seite im wesentlichen gleich.

5. Das Ergebnis von *Kajikawa,* daß der Austritt von Farbstoff in die vordere Kammer derjenigen Seite, die ihrer sympathischen Innervation beraubt worden ist, später erfolgt, wurde bestätigt. Andererseits tritt der Farbstoff früher auf, wenn die Injektion in ein Gebiet stattfindet, welches gleichfalls der sympathischen Innervation beraubt worden ist.

6. Aus den hier mitgeteilten Ergebnissen folgt, daß die einzelnen Gefäßgebiete sich hinsichtlich ihrer Permeabilität nach Beseitigung des sympathischen Einflusses verschieden verhalten.

Nachprüfung der Versuche von Kajikawa.

I. Versuchsreihe.

Das 1. Kaninchen (weiblich) wurde am 10. Januar 1923 um ¼4 Uhr operiert: Injektion von 2proz. Morphiumlösung 2 ccm pro 1 bis 2 kg Kaninchen. Dann wurden die Tiere ½ Stunden sich selbst überlassen, bis die Morphiumwirkung vollständig eingetreten war.

Die Tiere wurden alle mit einer schonenden und sicheren Methode operiert.

Das Operationsfeld wird von den Haaren befreit und mit einer 5proz. Jodlösung tüchtig desinfiziert. Der Hautschnitt wird, vorn an dem Hals beginnend, etwa 10 cm von der Medianlinie gemacht (linke Seite).

Als Farbstoff diente mir eine 0,4proz. Indigcarminlösung in 0,95proz. Kochsalzlösung.

Das 2. Kaninchen (männlich) wurde am 18. Januar 1923 um ½11 Uhr operiert. Durchschneidung des Halssympathicus und des Ganglion cerv. sup. und infer. auf der rechten Seite.

1. Kaninchen (weiblich).

Intramuskulärinjektion der Farbstofflösung am 12. Januar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
5h 05′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normal. Seite d. Halses) rechts	6h 20′	deutliches Blau
		6 30	sehr deutliches Blau
5 25	keine Farbe	7 00	hellblau
5 35	„ „	7 30	„
5 50	„ „	8 00	noch etwas Blau
6 00	blau	8 30	keine Farbe
6 10	deutliches Blau		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 45 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 2 Stunden.

1. Kaninchen (weiblich).

Intramuskulärinjektion der Farbstofflösung am 13. Januar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 30′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) links	12h 00′	hellblau
		12 10	„
11 00	keine Farbe	12 20	sehr schwaches Blau
11 15	„ „	12 30	„ „ „
11 20	blau	12 50	noch etwas blau
11 30	sehr deutliches Blau	1 20	„ „ „
11 40	deutliches Blau	1 50	keine Farbe
11 50	hellblau		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 45 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn (von 11h20′ bis 1h20′) 2 Stunden.

1. Kaninchen. Am 15. Januar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
2h 05′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) rechts	3h 30′	blau
		4 00	"
2 30	keine Farbe	4 30	schwaches Blau
2 50	" "	4 45	keine Farbe
3 00	etwas blau	5 00	" "

Der Körper des Kaninchens wird durch elektrische Beleuchtung erwärmt. Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 45 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 1½ Stunden.

1. Kaninchen. Am 15. Januar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
9h 50′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) links	12h 30′	sehr schwaches Blau
		1 00	" " "
10 20	keine Farbe	1 30	" " "
10 30	" "	2 00	" " "
10 35	blau	2 30	" " "
10 45	sehr deutliches Blau	3 00	" " "
11 00	deutliches Blau	3 30	" " "
11 15	" "	4 00	noch sehr wenig blau
11 45	schwaches Blau	4 40	" " " "
12 00	sehr schwaches Blau	5 00	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 40 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 4 Stunden 40 Minuten.

2. Kaninchen (männlich). Am 21. Januar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 20′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) links	12h 00′	schwaches Blau
		12 15	" "
10 40	keine Farbe	12 30	wenig Blau
10 45	blau	12 45	" "
11 00	"	1 00	" "
11 15	"	1 15	" "
11 30	sehr deutliches Blau	1 30	" "
11 45	hellblau	1 45	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 20 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 3 Stunden 15 Minuten.

2. Kaninchen. Am 22. Januar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
9h 40′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) rechts	11h 30′	sehr starkes Blau
		12 00	starkes Blau
10 00	keine Farbe	12 30	" "
10 15	" "	1 00	" "
10 20	bläulich	1 30	hellblau
10 30	starkes Blau	2 00	"
10 45	sehr starkes Blau	2 30	"
11 00	" " "	3 00	schwaches Blau
11 15	" " "	3 10	das Kaninchen †

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 25 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn über 4 Stunden 40 Minuten.

Sektionsbefund des 2. Kaninchens (männlich).

† am 22. Januar 1923.

An der Operationsstelle ein Geschwür nach innen, nicht offen nach außen.

Befund der Lunge . . . . . . normal
„ des Herzens . . . . . „
„ der Nieren . . . . . . „
„ des Magens . . . . . „

Dickdarm: er zeigte an einigen Stellen Rötung, eventuelle kleine subseröse Blutungen.

Dünndarm: Befund normal, ebenso zeigte die Harnblase keine erkennbare Veränderung.

Ursache des Exitus: Infektion?

Am 26. Januar 1923 wurde Kaninchen 3 operiert.

Operationsdauer von 11 bis 12½ Uhr.

Operationsseite: links.

3. Kaninchen (männlich). Am 29. Januar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
3h 00'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) rechts	5h 30'	blau
		6 00	deutliches Blau
3 20	keine Farbe	6 30	sehr deutliches Blau
3 40	„ „	7 00	deutliches Blau
3 50	„ „	7 30	schwaches Blau
4 00	bläulich (Harn sehr wenig)	8 00	noch schwaches Blau
4 30	„ „ „ „	8 30	weniges blau
4 45	blau	9 00	„ „
5 00	„	9 30	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 50 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 5 Stunden.

3. Kaninchen (männlich). Am 2. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 05'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) links	1h 30'	schwaches Blau
		2 00	„ „
10 30	—	2 30	„ „
10 40	—	3 00	noch sehr wenig blau
10 45	bläulich	3 30	„ „ „ „
11 00	blau	4 00	„ „ „ „
11 30	„	4 30	„ „ „ „
12 00	deutliches Blau	5 00	„ „ „ „
12 30	blau	5 30	keine Farbe
1 00	„		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 35 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 6 Stunden 15 Minuten.

3. Kaninchen (männlich). Am 5. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 05'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) rechts	11h 30'	deutliches Blau
		11 45	etwas schwaches Blau
10 30	keine Farbe	12 00	" " "
10 35	" "	12 30	schwach blau
10 40	bläulich	1 00	" "
10 50	blau	1 30	sehr schwach blau
11 00	sehr deutliches Blau	2 00	" " "
11 15	deutliches Blau	2 30	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 30 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 3 Stunden 20 Minuten.

1. Kaninchen (weiblich). Am 6. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 55'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) links	1h 00'	blau
		1 30	wenig blau
11 10	keine Farbe	2 00	sehr wenig blau
11 15	bläulich	2 15	blau
11 30	hellblau	2 30	"
12 00	sehr deutlich blau	2 45	keine Farbe
12 30	" " "		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 15 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 3 Stunden 30 Minuten.

1. Kaninchen (weiblich). Am 9. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
11h 00'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) rechts	12h 30'	hellblau
		1 00	"
11 20	keine Farbe	1 30	etwas schwaches Blau
11 25	" "	2 00	schwaches Blau
11 30	blau	2 30	" "
11 45	sehr deutliches Blau	3 00	keine Farbe
12 00	deutliches Blau		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 25 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 3 Stunden.

3. Kaninchen (männlich).
Intramuskulärinjektion der Farbstofflösung am 7. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 45'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) links	1h 00'	schwaches Blau
		1 30	sehr schwaches Blau
11 00	keine Farbe	2 00	schwaches Blau
11 15	" "	2 30	noch wenig Blau
11 20	bläulich	3 00	" " "
11 25	deutliches Blau	3 30	blaue Spur
11 45	sehr deutliches Blau	4 00	" "
12 00	deutliches Blau	4 30	" "
12 30	schwaches Blau	5 00	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 30 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn (von 11h 20' bis 4h 30') 5 Stunden 10 Minuten.

3. Kaninchen (männlich). Am 10. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
9h 10'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) rechts	12h 00'	deutliches Blau
		12 30	" "
9 30	keine Farbe	1 00	blau
9 45	" "	1 30	schwaches Blau
10 00	" "	2 00	" "
10 30	" "	2 30	sehr schwaches Blau
11 00	bläulich	3 00	keine Farbe
11 30	blau		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 1 Stunde 25 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 3½ Stunden.

1. Kaninchen (männlich). Am 16. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
9h 45'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) rechts	1h 00'	wenig blau
		1 30	" "
10 00	keine Farbe	2 00	" "
10 30	" "	2 30	" "
10 45	" "	3 00	" "
10 50	sehr deutliches Blau	3 30	" "
11 00	hellblau	4 00	" "
11 30	"	4 30	" "
12 00	etwas schwaches Blau	5 00	keine Farbe
12 30	schwaches Blau		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 1 Stunde. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 4 Stunden 40 Minuten.

3. Kaninchen (männlich). Am 19. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase		Zeit	Harn aus Harnblase	
1h 30'	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) links		5h 00'	blau	sehr wenig Harn (5h 00' – 9 30)
			5 30	"	
2 00	keine Farbe	sehr wenig Harn (2 00 – 4 30)	6 00	sehr schwaches Blau	
2 15	" "		6 30	blau	
2 20	blau		7 00	"	
2 30	sehr deutliches Blau		7 30	"	
3 00	blau		8 00	"	
3 30	deutliches Blau		8 30	"	
4 00	hellblau		9 00	"	
4 30	schwaches Blau		9 30	keine Farbe	

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 45 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 6 Stunden 45 Minuten.

1. Kaninchen (weiblich). Am 22. Februar 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
9h 50′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) links	1h 30′	hellblau
		2 00	"
10 30	keine Farbe	2 30	schwaches Blau
10 45	" "	3 00	" "
11 00	bläulich	3 30	sehr schwaches Blau
11 30	schwaches Blau	4 00	" " "
12 00	deutliches Blau	4 30	" " "
12 30	" "	5 00	" " "
1 00	" "	5 30	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 55 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 6 Stunden.

Nachprüfung der Versuche von Kajikawa.

II. Versuchsreihe.

Über die Chloridbestimmung der ins Kaninchen injizierten Kochsalzlösung, welche abgesaugt wurde.

Vorbereitung des Versuches:

a) Instrumente:

1. Mikrobürette nach *Bang*.
2. Die 3-ccm- und 1-ccm-Pipette.
3. Das Becherglas.
4. Feine Spritze (zum Absaugen).
5. Injektionsspritze (Kochsalzlösung).
6. Filtrierpapier.

b) Mittel:

1. n/100 Kochsalzlösung (*Merck*).
2. n/100 Silbernitratlösung (*Merck*).
3. 7proz. Kaliumchromatlösung (*Merck*).
4. Chromsäure-Schwefelsäuremischung.
5. 2proz. Kochsalzlösung (*Merck*).
6. 95proz. Alkohol.

c) Die Hähne der Bürette dürfen nicht eingefettet werden; die Bürette ist häufig mit Chromsäure-Schwefelsäuremischung zu reinigen.

d) Bei der Chloridbestimmung mit der n/100 Kochsalzlösung 3 ccm wurde von der n/100 Silbernitratlösung etwa 3,22, 3,24, 3,265, 3,245, 3,262, 3,248 am 26. Januar 1923 gebraucht.

Im Durchschnitt am 26. Januar 1923 = 3,2456.

Versuch der Chloridbestimmung.

Am 1. Februar 1923.

Ich habe um ½3 Uhr 50 ccm 2proz. Kochsalzlösung subkutan in den rechten Unterschenkel injiziert und um ½4 Uhr die Injektionslösung abgesaugt.

Konnte aber durch Saugen nicht die genügende Menge entnehmen, drückte das übrige dann aus.

1. Kaninchen (innere Seite des linken Unterschenkels).

Am 1. II. 1923 {
0,06 ccm : 1,2 mg.
(abgesaugte [n/100 Silbernitratlösung] Lösung).
normal : 0,3.
1,2 − 0,3 = 0,9. 60 mg : 0,5265 = 1 : X.
0,585 . 0,9 = 0,5265 mg NaCl. **0,8775 Proz. (nach 1 Std.).**

3. Kaninchen (innere Seite des linken Unterschenkels).

Am 3. II. 1923 {
0,06 ccm : 1,44 mg.
normal : 0,3.
1,44 − 0,3 = 1,14 mg.
0,585 . 1,14 = 0,66690. **1,1115 Proz. (nach $^{1}/_{2}$ Std.).**

1. Kaninchen (innere Seite des rechten Unterschenkels).

Am 5. II. 1923 {
60 mg : 1,18 mg.
normal : 0,4.
1,18 − 0,4 = 0,78.
0,585 . 0,78 = 0,4563 mg NaCl. **0,7605 Proz. (nach 1 Std.).**

3. Kaninchen (innere Seite des rechten Unterschenkels).

Am 6. II. 1923 {
60 : 1,58.
normal : 0,37.
0,585 . 1,21 = 0,70785 mg NaCl. **1,1797 Proz. (nach 20').**

Am 6. II. 1923 {
60 : 1,42.
1,42 − 0,37 = 1,05.
0,585 . 1,05 = 0,61425 mg NaCl. **1,0237 Proz. (nach 30 Min.).**

Am 6. II. 1923 {
60 : 1,38.
0,585 . 1,01 = 0,59085 mg NaCl. **0,9847 Proz. (nach 40 Min.).**

Am 6. II. 1923 {
60 : 1,435.
0,585 . 1,065 = 0,6230 mg NaCl. **1,038 Proz. (nach 1 Std.).**

Am 6. II. 1923 {
60 : 1,228.
0,585 . 0,858 = 0,50193 mg NaCl. **0,836 Proz. (nach $1^{1}/_{2}$ Std.).**

Versuch am normalen Kaninchen (männlich).

Normales Kaninchen (innere Seite des rechten Unterschenkels).

Am 7. II. 1923 {
60 : 1,46.
normal : 0.4.
0,585 . 1,06 = 0,6201 mg NaCl. **1,0335 Proz. (nach 20 Min.).**

Am 7. II. 1923 {
60 : 1,12.
0,585 . 0,72 = 0,4212 mg NaCl. **0,702 Proz. (nach 40 Min.).**

Am 7. II. 1923 {
60 : 1,02.
0,585 . 0,62 = 0,3627 mg NaCl. **0,6045 Proz. (nach 1 Std.).**

Am 7. II. 1923 {
60 : 0,925.
0,585 . 0,525 = 0,307125 mg NaCl. **0,5118 Proz. (nach $1^{1}/_{2}$ Std.).**

Am 7. II. 1923 {
60 : 0,845.
0,585 . 0,445 = 0,260325 mg NaCl. **0,4338 Proz. (nach 2 Std.).**

Der Versuch am normalen Kaninchen (männlich).

Das normale Kaninchen (innere Seite des linken Unterschenkels).

Am 10. II. 1923
- 60 : 1,72.
- normal : 0,1
- 0,585 . (1,72 − 0,1) = 0,9477 mg NaCl. **1,5795 Proz. (nach 20 Min.)**.

Am 10. II. 1923
- 60 : 1,61.
- 0,585 . 1,51 = 0,8835 mg NaCl. **1,4722 Proz. (nach 40 Min.).**

Am 10. II. 1923
- 60 : 1,36.
- 0,585 . 1,26 = 0,7371 mg NaCl. **1,2285 Proz. (nach 1 Std.).**

Am 10. II. 1923
- 60 : 1,15.
- 0,585 . 1,05 = 0,61425 mg NaCl. **1,0287 Proz. (nach 1½ Std.).**

Am 10. II. 1923
- 60 : 0,96.
- 0,585 . 0,86 = 0,5031 mg NaCl. **0,8885 Proz. (nach 2 Std.).**

Am 10. II. 1923
- 60 : 0.84.
- 0,585 . 0,74 = 0,4329 mg NaCl. **0,7215 Proz. (nach 2½ Std.).**

Normales Kaninchen. Am 12. März 1923.

Das Filtrierpapier, mit welchem die Lösung abgesaugt wurde, wird in 5 ccm Alkohol gelegt; nach 5 Stunden habe ich das Filtrierpapier mit 5 ccm Alkohol nachgewaschen. Es wurden 10 ccm Alkohol verwendet.

Linke Seite des Halses.

Um 3 Uhr 40 Min. injiziert (2proz. Kochsalzlösung, 20 ccm).

Nach 15 Min.
- Filtrierpapiergewicht 76 mg.
- Filtrierpapiergewicht + abgesaugte Lösung 142 mg.
- 142 − 76 = 66 mg.
- 66 : 2,23 (Silbernitratlösung).
- ohne NaCl : 0,15 (Silbernitratlösung).
- ∴ 0,585 . (2,23 − 0,15) = 1,2168 mg NaCl.
- ∴ 66 : 1,2168 = 1 : X = **1,848 Proz.**

Nach 45 Min.
- 156 − 87 = 69 mg.
- 69 : 1,46 (Silbernitratlösung).
- ∴ 0,585 . (1,46 − 0,15) = 0,76635 mg.
- ∴ 69 : 0,76635 = 1 : X = **1,110 Proz.**

Nach 1 Std 15 Min.
- 167 — 87 = 80 mg.
- 80 : 1,05.
- ∴ 0,585 . (1,05 . 0,15) = 0,5265.
- ∴ 80 . 0,5265 = 1 : X = **0,658 Proz.**

Nach 1 Std. 45 Min.
- 154 — 88 = 66.
- 66 : 102.
- ∴ 0,585 . (1,02 − 0,15) = 0,50895.
- ∴ 66 : 0,50895 = 1 : X = **0,7710 Proz.**

Rechte Seite des Halses.

Um 3 Uhr 48 Min. injiziert (2proz. Kochsalzlösung, 20 ccm).

Nach 15 Min.
- Filtrierpapiergewicht 76 mg.
- Filtrierpapier + abgesaugte Lösung 156 mg
- 156 — 76 = 80 mg.
- 80 : 2,35 (Silbernitratlösung).
- ohne NaCl : 0,15 (Silbernitratlösung).
- ∴ 0,585 . (2,35 − 0,15) = 1,2870 mg NaCl.
- ∴ 80 : 1,2870 = 1 : X = **1,608 Proz.**

Nach 45 Min.
166 — 86 = 80 mg (abgesaugte Menge).
80 : 1,77.
∴ 0,585 . (1,77 — 0,15) = 0,9477.
∴ 80 : 0,9477 = 1 : X = **1,184 Proz.**

Nach 1 Std. 15 Min.
152 — 88 ≐ 64 mg.
64 : 1,12.
∴ 0,585 . (1,12 — 0,15) = 0,56745 mg.
∴ 64 : 0,56745 = 1 : X = **0,886 Proz.**

Nach 1 Std. 45 Min.
148 — 87 = 61.
61 : 1,02.
∴ 0,585 . (1,02 — 0,15) = 0,50895.
61 : 0,50895 = 1 : X = **0,834 Proz.**

1. Kaninchen (weiblich). Am 14. Februar 1923. (Entnervte Seite links.)

Linke Seite des Halses.

Um 3 Uhr injiziert (2proz. Kochsalzlösung, 40 ccm), ohne NaCl : 0,12 (Silbernitratlösung).

Nach 30 Min.
130 — 76 = 54 mg.
54 : 2,38.
∴ 0,585 . (2,38 — 0,12) = 1.2781 mg NaCl.
∴ 54 : 1,2781 = 1 : X.
∴ **2,3668 Proz.**

Nach 1 Std.
128 — 84 = 44 mg.
44 : 1,48.
∴ 0,585 . (1,48 — 0,12) = 0,79560 mg NaCl.
∴ 44 : 0,7956 = 1 : X.
∴ **1,8081 Proz.**

Nach 2 Std.
140 — 84 = 56 mg.
56 : 1,2.
∴ 0,585 . (1,2 — 0,12) = 0,63180 mg.
∴ 56 : 0,6318 = 1 : X.
∴ **1,1282 Proz.**

Nach 3 Std.
124 — 77 = 47 mg.
∴ 0,585 . (0,8 — 0,12) = 0,39780 mg NaCl.
∴ 47 : 0,3978 = 1 : X.
∴ **0,8463 Proz.**

Rechte Seite des Halses.

Um 3 Uhr 10 Minuten injiziert (2proz. Kochsalzlösung, 40 ccm), ohne NaCl : 0,12 (Silbernitratlösung).

Nach 30 Min.
165 — 76 = 89 mg.
89 : 1,9.
∴ 0,585 . (1,9 — 0,12) = 1,04130 mg NaCl.
∴ 89 : 1,0413 = 1 : X.
∴ **1,17 Proz.**

Nach 1 Std.
200 — 84 = 116 mg.
116 : 2,47.
∴ 0,585 . (2,47 — 0,12) = 1,37475 mg NaCl.
∴ 116 : 1,37475 = 1 : X.
∴ **1,1851 Proz.**

Nach 2 Std.
156 — 84 = 72 mg.
72 : 1,3.
∴ 0,585 . (1,3 — 0,12) = 0,6903 mg.
∴ 72 : 0,6903 = 1 : X.
∴ **0,9587 Proz.**

Nach 3 Std.
- 127 — 76 = 51 mg.
- 51 : 0,87.
- ∴ 0,585 . (0,87 — 0,12) = 0,43875 mg.
- ∴ 51 : 0,43875 = 1 : X.
- ∴ **0,8602 Proz.**

3. Kaninchen (männlich). Am 16. Februar 1923. (Entnervte Seite, links.)

Rechte Seite des Halses.

Um 3 Uhr 50 Min. injiziert (2proz. Kochsalzlösung, 40 g), ohne NaCl: 0,12 (Silbernitratlösung).

Nach 1 Std.
- 160 — 84 = 76 mg abgesaugte Menge.
- 76 : 1,74.
- ∴ 0,585 . (1,74 — 0,12) = 0,9477.
- ∴ 76 : 0,9477 = 1 : X.
- ∴ **1,2469 Proz.**

Nach 2 Std.
- 148 — 84 = 64.
- 64 : 1,08.
- ∴ 0,585 . (1,08 — 0,12) = 0,5616.
- ∴ 64 : 0,5616 = 1 : X.
- ∴ **0,8775 Proz.**

Nach 3 Std.
- 136 — 84 = 52 mg.
- 52 : 0,8.
- ∴ 0,585 . (0,8 — 0,12) = 0,3978.
- ∴ 52 : 0,3978 = 1 : X.
- ∴ **0,765 Proz.**

Linke Seite des Halses.

Um 4 Uhr injiziert (2proz. Kochsalzlösung, 40 g), ohne NaCl: 0,12 (Silbernitratlösung).

Nach 1 Std.
- 180 — 84 = 96 mg.
- 96 : 1,86.
- ∴ 0,585 . (1,86 — 0,12) = 1,0179 mg NaCl.
- ∴ 96 : 1,0179 = 1 : X.
- ∴ **1,0603 Proz.**

Nach 2 Std.
- 132 — 84 = 48 mg.
- 48 : 1,285.
- ∴ 0,585 . (1,285 — 0,12) = 0,671425 mg NaCl.
- ∴ 48 : 0,671425 = 1 : X.
- ∴ **1,3988 Proz.**

Nach 3 Std.
- 102 — 84 = 18 mg.
- 18 : 0,43.
- ∴ 0,585 . (0,43 — 0,12) = 0,18135 mg NaCl.
- ∴ 18 : 0,18135 = 1 : X.
- ∴ **1,0075 Proz.**

(Ich habe die Zahlen mit einer Genauigkeit bis 1 Millionstel festgestellt.)

1. Kaninchen (weiblich). Am 19. Februar 1923. (Entnervte Seite links.)

Ohne NaCl: 0,16 (Silbernitratlösung).

Vorversuch
- 142 (2proz. Kochsalzlösung + Filtrierpapier) — 86 (Filtrierpapier) = 56 mg (Flüssigkeitsgewicht).
- 56 : 2,17 (Silbernitratlösung).
- ∴ 0,585 . (2,17 — 0,16) = 1,17585 mg NaCl.
- ∴ 21 : 0,21645 = 1 : X = **2,0997 Proz.**

Rechte Seite des Halses.

Um 10 Uhr 10 Min. injiziert

(nach 1 Stunde).

126 — 85 = 41 mg.
41 : 1,27 mg.
∴ 0,585 . (1,27 — 0,16) = 0,64935 mg.
∴ 41 : 0,64935 = 1 : X.
∴ **1,5862 Proz.**

(nach 2 Stunden)

137 — 85 = 57 mg.
52 : 1,15 mg.
∴ 52 : 0,527915 = 1 : X.
∴ **1,1187 Proz.**

(nach 3 Stunden)

114 — 85 = 29 mg.
29 : 0,91 mg.
∴ 29 : 0,43875 = 1 : X.
∴ **1,5129 Proz.**

(nach 4 Stunden)

102 — 85 = 17 mg.
17 : 0,53 mg.
∴ 17 : 0,21645 = 1 : X.
∴ **1,2678 Proz.**

(nach 5 Stunden)

106 — 85 = 21 mg.
21 : 0,53 mg.
∴ 21 : 0,21645 = 1 : X.
∴ **1,0307 Proz.**

Linke Seite des Halses.

Um ½11 Uhr injiziert

(nach 1 Stunde).

108 — 85 = 23 mg.
23 : 0,57 mg.
∴ 0,585 . (0,57 — 0,16) = 0,23985 mg NaCl.
∴ 23 : 0,23985 = 1 : X.
∴ **1,0428 Proz.**

(nach 2 Stunden)

132 — 85 = 47 mg.
47 : 1,01 mg.
∴ 47 : 0,49725 = 1 : X.
∴ **1,0579 Proz.**

(nach 3 Stunden)

146 — 85 = 61 mg.
61 : 1,22 mg.
∴ 61 : 0,6118 = 1 : X.
∴ **1,0029 Proz.**

(nach 4 Stunden)

107 — 85 = 22 mg.
22 : 0,63 mg.
∴ 22 : 0,27495 = 1 : X.
∴ **1,2497 Proz.**

(nach 5 Stunden)

120 — 85 = 35 mg.
35 : 0,65 mg.
∴ 35 : 0,28665 = 1 : X.
∴ **0,819 Proz.**

4. *Kaninchen* (männlich). Am 20. Februar 1923. (Entnervte Seite links.)

Ohne NaCl : 0,16 (Silbernitratlösung).

Vorversuch
164 (2proz. Kochsalzlösung + Filtrierpapier) — 86 (Filtrierpapier) = 80 mg (Flüssigkeitsgewicht).
80 : 2,78 (Silbernitratlösung).
∴ 0,505 . (2,78 — 0,16) = 1,5327 mg NaCl.
∴ 80 : 1,5327 = 1 : X.
∴ **1,9158 Proz.**

2proz. Kochsalzlösung, 40 ccm.

Rechte Seite des Halses.

Um 2 Uhr injiziert:

(nach 1 Stunde)

100 — 86 = 14 mg.
14 : 0,61 mg.
∴ 14 : 0,26325 = 1 : X.
∴ **1,8821 Proz.**

(nach 2 Stunden)

107 — 86 = 21 mg.
21 : 0,75 mg.
∴ 21 : 0,34515 = 1 : X.
∴ **1,6435 Proz.**

Linke Seite des Halses.

Um 2 Uhr 15 Min. injiziert:

(nach 1 Stunde)

112 — 86 = 26 mg.
26 : 0,85 mg.
∴ 26 : 0,40365 = 1 : X.
∴ **1,5525 Proz.**

(nach 2 Stunden)

154 — 86 = 68 mg.
68 : 1,46 mg.
∴ 68 : 0,7605 = 1 : X.
∴ **1,1183 Proz.**

(nach 3 Stunden)
118 — 86 = 32 mg.
32 : 0,79 mg.
∴ 32 : 0,36855 = 1 : X.
∴ **1,1517 Proz.**

(nach 4 Stunden)
108 — 88 = 20 mg.
20 : 0,51 mg.
∴ 20 : 0,20475 = 1 : X.
∴ **1,0237 Proz.**

(nach 3 Stunden)
116 — 86 = 30 mg.
30 : 0,63 mg.
∴ 30 : 0,27495 = 1 : X.
∴ **0,9185 Proz.**

(nach 4 Stunden)
118 — 88 = 30 mg.
30 : 0.61 mg.
∴ 30 : 0,26325 = 1 : X.
∴ **0,8741 Proz.**

3. Kaninchen (männlich). Am 22. Februar 1923.
(Entnervte Seite links.)

Vorversuch:
Ohne NaCl : 0,18 (Silbernitratlösung).
130 (NaCl-Lösung + Filtrierpapier) — 78 (Filtrierpapier) = 52 mg (NaCl-Lösung).
52 : 2,08 (Silbernitratlösung).
∴ 52 : 1,1115 = 1 : X.
∴ **2,1375 Proz.**

	Rechte Seite des Halses (um 11 Uhr 10 Min.).	Linke Seite des Halses (um 11 Uhr 20 Min.).
Nach 1 Std.	**1,1521 Proz.**	**0,9945 Proz.**
„ 2 „	**1,1084** „	**0,9225** „
„ 3 „	**0,936** „	**0,9040** „
„ 4 „	**0,8954** „	**0,8979** „
„ 5 „	**0,8266** „	**0,8357** „

1. Kaninchen (weiblich). Am 26. Februar 1923.
(Entnervte Seite links.)

Vorversuch:
Ohne NaCl : 0,25 (Silbernitratlösung).
124 (Filtrierpapier + Kochsalzlösung) — 76 (Filtrierpapiergewicht) — 48.
48 : 1,8 = 0,585 . (1,8 — 0,25) = 0,90675.
∴ 48 : 0,90675 = 1 : X.
∴ **1,8890 Proz.**

	Rechts (um 11 Uhr 20 Min.).	Links (um 11 Uhr 10 Min.).
Nach 1 Std.	**0,8728 Proz.**	**0,9088 Proz.**
„ 2 „	**0,855** „	**0,8815** „
„ 3 „	**0,8090** „	**0,7990** „
„ 4 „	**0,7844** „	**0,7445** „
„ 5 „	**0,7680** „	**0,7312** „

3. Kaninchen. Am 27. Februar 1923.

Vorversuch:
Ohne NaCl : 0,26.
140 — 79 = 61.
61 : 2,22.
0,585 . (2,22 — 0,26) = 1,14660.
∴ **1,8796 Proz.**

	Rechts (um 12 Uhr 10 Min.).	Links (um 12 Uhr 20 Min.).
Nach 1 Std.	**0,9251 Proz.**	**0,87 Proz.**
„ 2 „	**0,8043** „	**0,8088** „
„ 3 „	**0,8537** „	**0,8582** „
„ 4 „	**0,78** „	**0,8357** „

4. Kaninchen. Ohne NaCl: 0,27.

	Rechts (um 3/4 10 Uhr).	Links (um 10 Uhr).
Nach 1 Std.	**1,1097 Proz.**	**1,0856 Proz.**
„ 2 „	**1,058** „	**0,858** „

3. Kaninchen. Am 1. März 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
1h 10′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) links	4h 00′	schwaches Blau
1 30	keine Farbe	4 30	sehr schwaches Blau
1 35	„ „	5 00	blau
1 40	bläulich	5 30	„
2 00	sehr deutliches Blau	6 00	„
2 30	deutliches Blau	6 30	„
3 00	„ „	7 00	„
3 30	schwaches Blau	7 30	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 25 Minuten.
Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 5 Stunden 20 Minuten.

1. Kaninchen. Am 3. März 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
9h 00′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. entnervte Seite d. Halses) links	12h 30′	schwaches Blau
9 15	keine Farbe	1 00	sehr schwaches Blau
9 30	„ „	1 30	blau
9 40	bläulich	2 00	„
10 00	sehr deutliches Blau	2 30	„
10 30	deutliches Blau	3 00	„
11 00	blau	3 30	„
11 30	schwaches Blau	4 00	„
12 00	„ „	4 30	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 30 Minuten.
Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 6 Stunden 20 Minuten.

1. Kaninchen. Am 5. März 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 00′	Injektion d. Farbstofflösung (i. d. normale Seite d. Halses) rechts	12h 00′	deutliches Blau
10 15	keine Farbe	12 30	„ „
10 30	„ „	1 00	schwaches Blau
10 45	„ „	1 30	blau
10 50	„ „	2 00	„
10 55	bläulich	2 30	sehr schwaches Blau
11 00	deutliches Blau	3 00	blau
11 30	sehr deutliches Blau	3 30	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 50 Minuten.
Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 4 Stunden 5 Minuten.

3. Kaninchen. Am 6. März 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
9h 00′	Injektion d. Farbstofflösung	1h 00′	schwaches Blau
	(entnervte Seite) links	1 30	„ „
9 40	keine Farbe	4 30	„ „
9 50	bläulich	5 00	sehr schwaches Blau
10 30	sehr deutliches Blau	5 30	„ „ „
11 00	deutliches Blau	6 00	„ „ „
11 30	blau	6 30	„ „ „
12 00	„	7 00	„ „ „
12 30	hellblau	7 30	keine Farbe

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 40 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 9 Stunden 10 Minuten.

1. Kaninchen. Am 7. März 1923.

Zeit	Harn aus Harnblase	Zeit	Harn aus Harnblase
10h 00′	Injektion d. Farbstofflösung	1h 00′	schwaches Blau
	(normale Seite rechts)	1 30	sehr schwaches Blau
10 30	keine Farbe	2 00	„ „ „
10 50	„ „	2 35	„ „ „
10 55	bläulich	3 00	„ „ „
11 00	deutliches Blau	3 30	„ „ „
11 30	sehr deutliches Blau	4 00	„ „ „
12 00	hellblau	4 30	keine Farbe
12 30	schwaches Blau		

Zeit bis zum Auftreten des Farbstoffes nach Injektion 50 Minuten. Dauer der Entleerung des Farbstoffes im Harn 5 Stunden 5 Minuten.

Ich habe die Temperatur des Kaninchenohres in der fossa conchae (im pars anterior helicis) gemessen, um die normale und die entnervte Seite zu vergleichen.

Vergleich der Temperatur.

	Rechts (Normalseite)		Links (Operationsseite)
1. Kaninchen	$36^3/_5{}^0$	Messung am 7. III. 1923	$38^1/_5{}^0$
3. Kaninchen	37^0		$38^2/_5{}^0$
4. Kaninchen	$37^2/_5{}^0$		$39^2/_5{}^0$
5. Kaninchen	$36^2/_5{}^0$		39^0

Vergleich der Gefäßweite.

	Rechts		Links
4. Kaninchen	1 mm	Messung am 12. III. 1923	2 mm
1. Kaninchen	0,5 mm		1 mm
3. Kaninchen	0,6 mm		etwa 1 mm
5. Kaninchen	1 mm		1,5 mm

Die Größe der Blutgefäße ist bei beiden Ohren gleich geblieben. Es ist an dem Ohr der Operationsseite mit dem bloßen Auge eine sehr deutliche Veränderung zu sehen.

Über die Produkte prolongierter tryptischer Verdauung des Caseins.

Von

Sigmund Fränkel, Helene Gallia, Asriel Liebster und **Sergej Rosen.**

(Aus dem Laboratorium der Ludwig-Spiegler-Stiftung Wien.)

(Eingegangen am 30. November 1923.)

Im hiesigen Laboratorium wurde in einer Reihe von Arbeiten[1]) gezeigt, daß bei sehr lang andauernder Verdauung von Eiweiß (Casein) mit Trypsin statt der bei kurz dauernder Einwirkung von Trypsin beobachteten Spaltung der Eiweißkörper in die entsprechenden optisch-aktiven Aminosäuren andere Produkte auftreten, die als Umwandlungsprodukte der vorerst gebildeten Aminosäuren zu deuten sind. Dabei wurde eine Reihe neuer, durch Fermente bedingter Wirkungen gefunden, die von größtem physiologischem und chemischem Interesse sind. Das Gemisch von Reaktionsprodukten, welches bei der Aufspaltung von Casein mit Trypsin in soda-alkalischer Lösung nach zweimonatiger Einwirkung entsteht, zeichnet sich besonders dadurch aus, daß seine Entmischung nach höchst einfachen Methoden glatt geht, ohne daß man zu den bekannten eingreifenden Methoden Zuflucht nehmen muß, welche sonst zur Isolierung der Aminosäuren verwendet werden müssen, welche ja auch keine Garantie bieten, daß man unveränderte Substanzen erhält. Es wurden mehrere Gruppen von Erscheinungen beobachtet.

So konnte man vorerst, und das war ja der Ausgangspunkt der Untersuchungen, finden, daß das l-Tryptophan und das l-Tyrosin, der Hauptsache nach, sich in das bis dahin unbekannte d-Tryptophananhydrid bzw. d-Tyrosinanhydrid verwandeln. Diese Anhydride sind dermaßen konstituiert, daß zwei Carboxylgruppen derselben Aminosäure unter Wasseraustritt miteinander reagieren. Der Umstand, daß diese Anhydride die der Ausgangssubstanz entgegengesetzte Drehung

[1]) *S. Fränkel* und *E. Feldsberg*, diese Zeitschr. **120**, 218, 1921; *S. Fränkel* und *P. Jellinek*, ebendaselbst **130**, 592, 1922; *S. Fränkel* und *K. Gallia*, ebendaselbst **134**, 308, 1922.

zeigen, konnte entweder in der Weise erklärt werden, wie es ja bei einzelnen Tyrosinderivaten bekannt war, daß das Umwandlungsprodukt der l-Verbindung rechts dreht, oder in der Weise, daß das l-Tyrosin vorerst in das d-Tyrosin übergeht und dieses durch die Wirkung des von uns *Anhydrase* benannten wasserabspaltenden Ferments in das *rechts*drehende Anhydrid übergeht. Durch die Auffindung des *d-Tyrosins* unter den Spaltungsprodukten des Caseins bei der prolongierten Verdauung ist die Entstehung[1]) des d-Tyrosinanhydrids (wahrscheinlich auch analog die des d-Tryptophananhydrids) in der Weise zu erklären, daß fermentativ l-Tyrosin in d-Tyrosin analog der *Walden*schen Umkehrung verwandelt wird, und das d-Tyrosin dann durch die Anhydrase in das d-Tyrosinanhydrid übergeht. Das supponierte Ferment wurde nach dieser Wirkung *Waldenase* genannt.

Bei anderen Aminosäuren wurde aber die gleiche Beobachtung nicht gemacht. Sie wurden zum Teil in derjenigen optisch aktiven Form gefunden, wie sie auch sonst bei der sauren Hydrolyse gefunden wurden, wie die l-Asparaginsäure, das d-iso-Leucin, zum Teil aber als Razemverbindungen wie das Oxyprolin, Serin, Alanin, Glutaminsäure, zum Teil aber in beiden Formen, sowohl in der optisch aktiven, als auch in der Razemform wie das Valin, und zwar mit der gleichen Drehung, wie sie sonst bei den aus Eiweiß isolierten Aminosäuren beobachtet wird.

Man sieht also bei der prolongierten Verdauung, daß ein Teil der Aminosäuren razemisiert wird.

Aber die Einwirkung geht unter Umständen noch weiter, da Methylamin gefunden wurde, welches aus Glykokoll durch Abspaltung der Carboxylgruppe entstanden war.

Wir haben in der Folge dieser Untersuchungen nun weitere Aminosäuren isoliert, welche das Bild erweitern und vervollständigen, das sich uns beim Studium der tryptischen Spaltung in einer langen Periode entrollt.

Es ist uns gelungen, das l-Prolin und das d-Isoleucin auf eine höchst einfache Weise zu gewinnen.

Sehr auffallend war bei diesen Untersuchungen, daß bis jetzt kein Leucin gefunden wurde, sondern nur das sonst so schwer isolierbare Isoleucin. Wie bekannt, hat man lange Zeit das Leucin als eine einheitliche Substanz betrachtet und als solche beschrieben, bis es *F. Ehrlich* gelungen ist, die Leucinkupfersalze durch Methylalkohol zu scheiden, wobei sich herausstellte, daß die als Leucin beschriebene Verbindung aus einem Gemisch von Leucin und Isoleucin besteht,

---

[1]) *S. Fränkel* und *K. Gallia*, l. c.

von denen das eine eine Methyl-Methyl- und das andere eine Methyl-Äthylverbindung ist.

Bei weiteren Untersuchungen sind drei Aminosäuren gefunden worden, die zur Aufklärung des ganzen Reaktionsverlaufes beitragen, und zwar *d, l-Serin*, *l-Asparaginsäure* und *d-Leucinanhydrid*.

Das Serin, welches bei den Spaltungen oft als l-Serin gefunden wird, ist in die Razemform übergegangen. Die l-Asparaginsäure hat diese Umwandlung nicht mitgemacht. Wir sehen also drei Formen: 1. Die Razemform: Alanin, Glutaminsäure, Oxyprolin und Serin. 2. Gar keine Veränderung: d-Isoleucin und l-Asparaginsäure. 3. Übergang in die optische Antipode und teilweise Anhydridbildung: Tyrosin, Tryptophan und Leucin.

Bei unseren Untersuchungen ist gefunden worden:

1. d-Tyrosinanhydrid,
2. d-Tryptophananhydrid,
3. Histidinanhydrid (?),
4. d-Leucinanhydrid,

entstanden sowohl durch die Wirkung der Anhydrase, wie auch der Waldenase.

5. d-Alanin,
6. d-Glutaminsäure,
7. l-Oxyprolin,
8. d-Valin (nur zum Teil),
9. l-Serin,

werden razemisiert.

10. l-Prolin,
11. d-Isoleucin,
12. d-Valin (nur zum Teil l-Asparaginsäure),

erleiden keine Veränderung.

13. Glykokoll

unterliegt zum Teil der Einwirkung der Decarboxylase.

Wie oben erwähnt, war es sehr auffallend, daß man bei den bisherigen Untersuchungen nur das Isoleucin aufgefunden hat, ohne das dieses gewöhnlich begleitende Leucin isolieren zu können. Es ist uns gelungen zu zeigen, daß das Leucin bei der prolongierten Verdauung in das Anhydrid übergeht, während das isomere Isoleucin unverändert bleibt.

Bis nun sind in der Literatur bekannt zwei Arten von Leucinanhydriden, beide auf synthetischem Wege dargestellt. *Emil Fischer*[1]) beschreibt in seiner Arbeit „Synthese der Polypeptide" das l-Leucyl-l-Leucin, welches peptidartig gebunden ist und beim Behandeln von

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 39, 2893, 1906.

d, α-Bromisocapronyl-l-Leucin mit 25proz. Ammoniak gewonnen wird und aus Wasser oder Alkohol in langen zugespitzten Nadeln kristallisiert. Die zweite Form, die durch Vereinigung beider Carboxylgruppen unter Wasseraustritt zustande gekommen ist, erhielt *Destrem*[1]) bei der Einwirkung von Benzoylchlorid auf Leucin bei 100° C neben Benzoyl-Leucin als amorphen, in Alkohol unlöslichen Körper.

Das von uns isolierte Leucinanhydrid stimmt in seinen Eigenschaften mit dem von *Destrem* beschriebenen vollkommen überein. Es ist also als ein unter Wasserabspaltung beider Carboxylgruppen zustande gekommenes Anhydrid aufzufassen.

Ferner wurde das d, l-Serin gefunden.

Wie aus dem Versuchsteil ersichtlich, gelangten wir zum d, l-Serin auf ganz einfache Weise. Zur scharfen Feststellung haben wir das β-Naphthalinsulfoderivat dargestellt.

Ferner wurde die in wässeriger Lösung links- und in salzsaurer Lösung rechtsdrehende Asparaginsäure gefunden. Die von uns isolierte Asparaginsäure verhält sich in ihrem optischen Drehungsvermögen wie die von *E. Fischer* beschriebene. Die Asparaginsäure ist also eine von den Aminosäuren, die bei der prolongierten tryptischen Verdauung keine Veränderung erleiden, ähnlich wie das d-Isoleucin.

Versuchsteil.

l-Prolin.

Dieses wurde von *E. Fischer* nach der Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure nach der Estermethode gewonnen. Da es zweifelhaft war, ob dieses Prolin ein Primärprodukt oder erst durch die Einwirkung der Salzsäure sich bildet, wurden zahlreiche Versuche angestellt[2]), bei denen schließlich der Nachweis des Entstehens des Prolins bei rein fermentativer Eiweißspaltung durch Pepsin-Salzsäure und Trypsin gelang.

Während bei allen Versuchen *E. Fischers* und seiner Mitarbeiter nur geringe Spuren von Prolin als Primärprodukt gefunden wurden, sehen wir bei unserer Untersuchung das Prolin in reichlicher Menge in freiem Zustande entstehen, und ohne die komplizierten Wege ist es rein darstellbar.

Das von uns dargestellte *l-Prolin* wurde lediglich in der *optisch-aktiven Form* gefunden, und zwar drehten 0,04149 g Substanz in wässeriger Lösung, deren Gesamtgewicht 1,7201 g betrug und die die Dichte 1,006 hatten, im 0,5-dm-Rohr 0,09° nach links, also hatten wir die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{12°} = -74{,}08°$, während *E. Fischer* für sein reinstes Präparat $\alpha_D^{20} = -77{,}40°$ angibt. Wir hatten also ein sehr reines Produkt gefunden.

Wir setzten unsere Verdauung mit 500 g reinstem dänischen Casein an. Dieses schwemmten wir in 5 Liter 0,8proz. Sodalösung auf, setzten

---

[1]) C. r. 86, 484; Bull. 30, 561 (2).

[2]) *S. P. L. Sörensen* und *A. C. Andersen*, C. r. du Lab. de Carlsberg 6, 140, 1905; Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 236, 1908; *E. Fischer* und *E. Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 81, 1903; 40, 215, 1903; *Salasckin* und *Kowalewsky*, ebendaselbst 38, 567, 1903.

2 g Pankreatin zu, schüttelten mit Chloroform und überschichteten mit Toluol, um Fäulnis zu vermeiden. Hierauf wurde die Lösung im Thermostaten bei 37° 60 Tage lang stehengelassen. Nach dieser Zeit zeigte weder die Lösung noch der Niederschlag Biuretreaktion.

Nun wurde die Lösung von dem Niederschlage abfiltriert, dieser mit Alkohol nachgewaschen, das alkoholische Filtrat mit dem Hauptfiltrat vereinigt und dieses von Toluol im Scheidetrichter getrennt.

Der Niederschlag wurde mehrmals mit Wasser ausgekocht; beim Einengen dieser Auskochwässer kristallisierte das von *Fränkel* und *Feldsberg* gefundene ***Tyrosinanhydrid*** aus.

Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure neutralisiert und mit Quecksilbersulfat in 5 vol.-proz. Schwefelsäure gefällt, der Niederschlag 24 Stunden absitzen gelassen und abfiltriert. Dieser enthielt das Tryptophananhydrid. Das Filtrat wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff quantitativ vom Quecksilber befreit und der Schwefelwasserstoff durch Durchleiten von Luft verdrängt.

Nun wurde, wie in der Arbeit von *S. Fränkel* und *K. Gallia* angegeben ist, direkt diese schwefelsaure Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Wir verwendeten dazu nicht käufliche Phosphorwolframsäure, sondern ein von uns selbst nach der Methode von *Winterstein*[1]) dargestelltes reines, vollständig ätherlösliches Präparat. 30 g lösten wir in 300 ccm Wasser und fällten damit das von Quecksilbersulfid quantitativ befreite schwefelsaure Filtrat. Wir setzten so lange von dem Reagens zu, bis in einer kleinen Probe des Filtrats kein Niederschlag mehr entstand. Nun ließen wir den Niederschlag absitzen und filtrierten von ihm ab. Wir arbeiteten zunächst das Filtrat auf, während die Aufarbeitung des Niederschlages in einer anderen Arbeit unseres Instituts beschrieben werden wird.

Das Filtrat wurde mit reinem, mehrfach umkristallisiertem Ätzbaryt neutralisiert, dann wurde abfiltriert und durch Einleiten von Kohlensäure der Überschuß an Barium niedergeschlagen. Nachdem dieser quantitativ entfernt war, indem die Lösung unter vermindertem Druck immer wieder eingeengt wurde und die Bariumcarbonatniederschläge immer mit heißem Wasser nachgewaschen wurden, bis eine Probe davon beim Erhitzen mit Natronkalk in einer Eprouvette kein Ammoniak entwickelte, begannen organische Kristalle auszufallen, die sich als ein Gemisch verschiedener Aminosäuren erwiesen.

Aus diesem Gemisch wurden zunächst ***Valin*** und ***Tyrosin*** durch fraktionierte Kristallisation in reinem Zustande gewonnen, wie in der zitierten Arbeit von *S. Fränkel* und *K. Gallia* beschrieben ist.

Das Filtrat nach der dort erwähnten sechsten Kristallfraktion (Valin) wurde unter stark vermindertem Druck weiter eingeengt. Dabei resultierte ein dicker brauner Sirup, der reichlich mit weißen Kristallen durchsetzt war.

Der Kristallbrei wurde mit Alkohol in der Kälte mehrmals ausgelaugt, die alkoholischen, trüb aussehenden Flüssigkeiten abgegossen, miteinander vereinigt und 3 Tage an einem kühlen Orte stehengelassen. Nach dieser Zeit konnte man nach Abfiltrieren der weißen Kristalle eine klare Lösung erhalten. Der Niederschlag erwies sich nach mehrmaligem Umkristallisieren durch Schmelzpunkt und Analysenresultate als *Valin*. In diesem Filtrat fanden wir *l-Prolin*.

---

[1]) *Winterstein*, Chem.-Zeitung **22**, 539.

Der braune Sirup, der nach dem Abgießen de alkoholischen Flüssigkeit am Boden blieb, wurde besonders behandelt, wie später ausgeführt wird. Er enthält das *d-Isoleucin*.

l-Prolin.

Aus der alkoholischen Mutterlauge schossen beim Einengen gelbliche Kristalle an. Sie wurden in möglichst wenig heißem Wasser gelöst, dann in der Kälte mit Alkohol gefällt. Diese Fällung erwies sich als weiteres *Valin*. Das alkoholische Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt. Nun stellte man es wieder an einen kühlen Ort, um der Substanz Zeit zum Auskristallisieren zu lassen. Die ausgefallenen Kristalle wurden wiederholt aus heißem Wasser umkristallisiert, bis der Schmelzpunkt keine Änderung mehr zeigte.

Die Substanz schmolz bei 220 bis 222°. Dann schritten wir zu Analysen, die anfangs sehr erschwert waren, da die Substanz, die bei 105° getrocknet war, während der Einwage begierig Wasser anzog. Erst als die Wägungen in geschlossenen Röhrchen ausgeführt wurden, gelangten wir zu übereinstimmenden Analysenresultaten.

Die Verbindung kristallisiert nämlich mit 1 Mol. Kristallwasser. Hat man ihr dieses entzogen, so zieht sie an der Luft begierig Feuchtigkeit an[1]).

2,892 mg Substanz . . .	0,302 ccm N	(14°, 744 mm)	
2,019 „ „ . . .	0,216 „ „	(17°, 739 „)	
4,169 „ „ . . .	8,000 mg CO_2	2,977 mg H_2O	
3,796 „ „ . . .	7,288 „ „	2,718 „ „	
Ber. für $C_5H_9O_2N$ (Prolin):	52,15 Proz. C,	7,88 Proz. H,	12,17 Proz. N,
Gef.	52,35 „ „	7,99 „ „	12,16 „ „
	52,38 „ „	8,01 „ „	12,24 „ „

Beim Erhitzen einer Probe im Glühröhrchen entwichen weiße Wolken, die den für Pyrrolidinderivate charakteristischen Geruch nach zerriebenen grünen Bohnen zeigten und einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan rot färbten. Die Analysen und Reaktionen zeigen also, daß wir es mit *Prolin* zu tun haben.

Untersuchung der optischen Aktivität des Prolins in wässeriger Lösung mittels der Mikropolarisation nach E. Fischer[2]).

Wir bereiteten eine Lösung von 0,04149 g Substanz in Wasser, Gesamtgewicht der Lösung 1,7201 g, Dichte 1,006. Die Drehung im 0,5-dm-Rohr betrug 0,09° nach links, also die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{12°} = -74,08°$. Diese Drehung kommt der stärksten bisher bei natürlicher l, α-Pyrrolidincarbonsäure gefundenen sehr nahe. *E. Fischer*[3]) fand bei seiner aus Casein gewonnenen l, α-Pyrrolidincarbonsäure in einer 7,4 proz. wässerigen Lösung als höchsten Wert $[\alpha]_D^{20°} = -77,4°$. Wir haben also *auf eine sehr einfache Weise das l-Prolin isoliert und rein dargestellt.* Unser Schmelzpunkt war allerdings bedeutend höher als der von *E. Fischer*[3]) gefundene. Dieser Autor gibt 206 bis 209° als Schmelzpunkt für reines l-Prolin an. Doch

---

[1]) *S. P. L. Sörensen*, C. r. du Lab. de Carlsberg **6**, 156, 1905.

[2]) Biochem. Arbeitsmeth. V., **1**, 572; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **44**, 129, 1911.

[3]) *E. Fischer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 164, 1901.

fanden *A. Kossel* und *H. D. Dakin*[1]) für dieselbe Substanz den Schmelzpunkt 220 bis 222°, der mit dem von uns gefundenen Werte vollständig übereinstimmt.

d-Isoleucin.

Ferner ist es uns gelungen, das *d-Isoleucin*, welches sich bekanntlich nur äußerst schwer nach dem Kupferverfahren vom d-Leucin trennen läßt, durch bloße fraktionierte Kristallisation zu isolieren. Früher erfolgte die Abtrennung des Rohleucins, das ist Leucin + Isoleucin, nach sehr komplizierten Methoden. Aus dem Gemisch mußte man dann erst durch Überführung in die Kupfersalze das Isoleucin vom Leucin trennen, die auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit in Methylalkohol voneinander geschieden werden konnten. Wir haben das d-Isoleucin sehr rein direkt dargestellt, ohne das Leucin in die gleiche Fraktion überhaupt zu bekommen, und so einen neuen, sehr einfachen Weg zu seiner Bereitung angegeben. *F. Ehrlich*[2]) hat diese Substanz aus Melasseschlempe gewonnen und von Leucin getrennt; doch gelang es noch nicht, Substanzen gleicher Reinheit auch aus anderen Eiweißstoffen zu gewinnen. Der Grund dafür war wahrscheinlich, daß Melasseschlempe und damit auch das Eiweiß der Rüben neben Isoleucin Valin nicht enthalten, daß aber diese Aminosäure, die ein in Methylalkohol genau so leicht lösliches Kupfersalz bildet[3]) wie das Isoleucin, in allen anderen bisher untersuchten Eiweißstoffen in größerer oder geringerer Menge vorhanden ist und infolge ihrer Tendenz, mit dem Isoleucin Mischkristalle zu bilden, stets die völlige Reindarstellung des Isoleucins hindert.

Auch das Isoleucin aus Blutfibrin[4]) verdankt seine um 2° niedrigere Drehung nicht, wie früher angenommen wurde, der Gegenwart von Leucin, das sich vielmehr stets quantitativ vom Isoleucin über die Kupfersalze abtrennen ließ, sondern, wie eingehende Untersuchungen gezeigt haben, einer geringen Beimengung von Valin, die infolge der geringen Unterschiede in der Elementarzusammensetzung der beiden Aminosäuren oft aus der Analyse kaum zu ersehen ist, aber sich in den für die optische Drehung erhaltenen Werten meist deutlich zu erkennen gibt. Daher ließ sich Isoleucin vom Valin durch die angewandten Methoden, wie z. B. die Kupfersalze, nicht trennen, sondern man erhielt nur Gemische aus ungefähr gleichen Teilen von Isoleucin und Valin, die auch durch noch so häufig durchgeführte fraktionierte Kristallisation der Aminosäuren selbst und ihrer Salze und Derivate nicht zu trennen waren. Dabei blieb es gleichgültig, ob das Rohleucin, das als Ausgangsmaterial diente, durch direktes Eindampfen der von der Säure befreiten hydrolysierten Lösungen oder aus den betreffenden Fraktionen nach der *Fischer*schen Estermethode gewonnen war, stets wurden ungefähr gleich zusammengesetzte Mischkristalle aus Isoleucin und Valin erhalten. Ähnliche Erfahrungen sind auch von anderer Seite an verschiedenen Eiweißstoffen gemacht worden. Nach vielen vergeblichen Versuchen gelang schließlich *F. Ehrlich* die ungefähre Abtrennung von Isoleucin aus valinreichen Eiweißstoffen in der Weise, daß die zuerst erhaltenen Gemische von Isoleucin und Valin zunächst mit Barytwasser unter Druck erhitzt, dann wie üblich wieder in die Kupfersalze verwandelt

---

[1]) *A. Kossel* und *H. D. Dakin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 411, 1904.
[2]) *F. Ehrlich*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **40**, 2438, 1907.
[3]) *E. Schulze* und *Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 38, 1905.
[4]) *F. Ehrlich*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **37**, 1809, 1904.

und diese mit kaltem Methylalkohol geschüttelt oder mit Äthylalkohol ausgekocht wurden, wobei das Kupfersalz des zum Teil umgelagerten Isoleucins langsam in Lösung geht, während die Kupferverbindung des razemischen Valins, die von Methylalkohol in nur sehr geringem Maße, von Äthylalkohol gar nicht aufgenommen wird, fast vollständig ungelöst bleibt. Es wurde aber nur eine sehr geringe Ausbeute erhalten.

d-Isoleucin.

Der mit Alkohol ausgelaugte Sirup wurde, nachdem die alkoholische Flüssigkeit abgegossen war, einige Tage im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure stehengelassen. Es entstand ein dicker Kristallbrei, den wir auf Tonplatten strichen und unter vermindertem Druck über Schwefelsäure einige Tage stehen ließen. Dann wurden die Kristalle, die nahezu rein weiß waren, von den Tonplatten abgekratzt und durch Umkristallisieren aus heißem Wasser von den anhaftenden Tonteilchen getrennt.

Es fielen schöne weiße Kristalle aus, die schwer zu benetzen waren und sich ziemlich schwer in Wasser lösten. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser, anfangs unter Zusatz von Tierkohle, konnte die Substanz mit konstantem Schmelzpunkt erhalten werden.

Sie schmolz bei 284° (*Block Maquenne*).

Die Analysen ergaben folgende Resultate:

2,430 mg Substanz . . .	0,223 ccm N (15,5°, 747 mm)		
2,111 „ „ . . .	0,195 „ „ (16,0°, 747 „)		
5,190 „ „ . . .	10,440 mg CO_2	4,642 mg H_2O	
4,618 „ „ . . .	9,306 „ „	4,066 „ „	

Ber. für Leucin $C_6H_{13}NO_2$:	54,92 Proz. C,	9,99 Proz. H,	10,68 Proz. N
Gef.	54,88 „ „	10,01 „ „	10,67 „ „
	54,97 „ „	9,85 „ „	10,72 „ „

Mikropolarisation des Isoleucins in wässeriger und salzsaurer Lösung.

Zur Entscheidung, ob wir das Leucin oder Isoleucin in Händen hatten, mußten wir die optische Aktivität der Substanz in wässeriger und salzsaurer Lösung bestimmen. Denn das d-Leucin dreht die Ebene des polarisierten Lichtes in wässeriger Lösung rechts, in salzsaurer Lösung hingegen links; und umgekehrt dreht das l-Leucin in wässeriger Lösung links, in salzsaurer rechts.

Hingegen dreht das d-Isoleucin in wässeriger und salzsaurer Lösung rechts, das l-Isoleucin in beiden Fällen links.

Wir bedienten uns bei der Untersuchung der optischen Aktivität unserer Substanz der Mikropolarisationsmethode nach *E. Fischer* und fanden beide Male sowohl in wässeriger als auch in salzsaurer Lösung Rechtsdrehung, haben also das d-Isoleucin vor uns.

Wir bereiteten eine Lösung von 0,031797 g Substanz in Wasser. Das Gewicht der Lösung betrug 2,0378 g, die Dichte 1,004. Die Drehung im 0,5-dm-Rohr 0,01° nach rechts. Demnach $[\alpha]_D^{120} = +12,77°$.

Nun untersuchten wir dieselbe Substanz auf ihre Drehung in salzsaurer Lösung: 0,02307 g Substanz gaben, in Salzsäure von der Dichte 1,15

gelöst, Gesamtgewicht der Lösung 2,1169 g, Dichte derselben 1,1141, eine Drehung von 0,24° nach rechts. Demnach $[\alpha]_D^{12^0} = +39{,}53^0$.

Unsere Werte stimmen nahezu mit den Werten überein, die *Locquin*[1]) für das synthetisch dargestellte Produkt fand, und die die höchsten Werte sind, die in der Literatur angegeben sind.

Er fand für eine 3,08proz. Lösung von d-Isoleucin in Wasser $[\alpha]_D = +11{,}29^0$. Für eine 4,64 Proz. d-Isoleucin enthaltende in 20proz. Salzsäure $[\alpha]_D^{20^0} = +40{,}61^0$.

Unsere Werte sind bedeutend *höher* als die Drehung, die *F. Ehrlich*[2]) für sein aus Melasseschlempe gewonnenes, also auch natürliches d-Isoleucin angibt.

Die Substanz von *F. Ehrlich*, welche aus Melasseschlempe gewonnen und von Leucin getrennt war, zeigte den Drehungswert $[\alpha]_D^{20^0} = +9{,}74^0$.

Unser Präparat zeigte eine Drehung von $[\alpha]_D^{12^0} = +12{,}77^0$, war also am reinsten, denn *Locquins* synthetisches Präparat ergab nur einen Drehungswert von $[\alpha]_D^{20^0} = +11{,}29^0$.

Die kleinen Differenzen zwischen unseren Werten und den Werten für das synthetisch dargestellte Präparat können durch Versuchsfehler bedingt sein, die sich infolge unserer kleinen Einwagen gleich sehr vergrößern. Denn bei der Mikropolarisation bedingt ein Ablesungsfehler von 0,01° gleich eine Änderung der spezifischen Drehung um mehrere Grade. Unser Präparat dürfte also sehr rein sein, wofür auch spricht, daß es bei 284° unter Schäumen schmilzt, das Präparat von *F. Ehrlich* aber bei 280° (unkorrigiert), was ja ebenso wie die Drehungswerte mit dem reinsten bisher dargestellten Präparat ziemlich übereinstimmt.

Durch diese Untersuchung haben wir 1. unzweifelhaft bewiesen, daß das l-Prolin ein direkter Bestandteil des Eiweißes ist, also nicht erst als sekundäres Produkt bei der Veresterungsmethode entsteht, da wir ja gar keine Säure angewendet haben; 2. haben wir eine höchst einfache Methode ausgearbeitet, das l-Prolin darzustellen und vollkommen rein, ohne Razemkörper zu gewinnen. Dank unserer sehr schonenden Arbeitsweise, haben wir ein Produkt erhalten, das der stärkst drehenden bisher gefundenen l, α-Pyrrolidincarbonsäure sehr nahe kommt.

Es erweist sich, daß das l-Prolin und d-Isoleucin im Gegensatz zu den in früheren Arbeiten von uns beschriebenen Tatsachen durch die prolongierte Einwirkung des pankreatischen Ferments keine Veränderung erleidet.

Nun wichen wir von dem in den früheren Arbeiten geübten und dem oben beschriebenen Verfahren ab. Wir ließen das nun alkoholhaltige Filtrat der Verdauung 14 Tage stehen, ohne es vorher mit Quecksilber und Phosphorwolframsäure zu fällen. Dabei schied sich ein Körper aus. Da er ganz braun war, wurde er mehrmals mit Tierkohle gekocht und zuerst aus Wasser umkristallisiert. In Wasser war er aber sehr leicht löslich. Wir kochten ihn mit Alkohol, filtrierten den unlöslichen Teil ab und engten das alkoholische Filtrat ein. Dabei schied sich ein Körper aus, der nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol einen konstanten Schmelzpunkt zeigte.

---

[1]) *R. Locquin*, Bull. de la Soc. chim. (4) 1, 604, 1907.
[2]) *F. Ehrlich*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 41, 1453, 1908.

Dieser Schmelzpunkt (200°)[1]) ist mit dem der d, l-Glutaminsäure identisch. Der Körper wurde bei 100° getrocknet und analysiert.

5,372 mg Substanz . . .	8,091 mg CO_2	2,987 mg H_2O	
6,443 „ „ . . .	9,563 „ „	3,586 „ „	
3,582 „ „ . . .	0,301 ccm N	(16°, 743 mm)	
2,733 „ „ . . .	0,230 „ „	(18°, 743 „)	
Ber. für $C_5H_9NO_4$ (Glutaminsäure)	40,80 Proz. C	6,17 Proz. H	9,52 Proz. N
Gef.	41,09 „ „	6,22 „ „	9,70 „ „
	40,49 „ „	6,23 „ „	9,65 „ „

Die von uns isolierte Glutaminsäure erwies sich beim Polarisieren im *Landolt-Lippich*schen Halbschattenpolarisationsapparat als optisch inaktiv. Es war also die *d, l-Glutaminsäure.*

d, l-Oxyprolin.

Den in Alkohol unlöslichen Teil der oben erwähnten Fraktion lösten wir in Wasser. Da er aber in Wasser sehr leicht löslich war und daher schlecht kristallisierte, versuchten wir, ihn mit Alkohol zu fällen. Bei Zusatz von Alkohol trübte sich die Flüssigkeit, und bei weiterem Zusatz von Alkohol fiel der Körper in fettig glänzenden Blättchen aus. Diese Operation wurde noch einmal wiederholt. Der Körper hat den Schmelzpunkt 270° in der zugeschmolzenen Kapillare erhitzt, der dem von *S. Fränkel* und *P. Jellinek* gefundenen Oxyprolin entspricht. Die Dämpfe färbten einen mit Salzsäure benetzten Fichtenspan rötlich (Pyrrolreaktion). Es war also sicher, daß es tatsächlich das Oxyprolin war.

d, l-Alanin.

Die von der Glutaminsäure und vom Oxyprolin abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit viel Alkohol versetzt und im Vakuum stark eingeengt. Beim Erkalten fiel aus der Flüssigkeit eine harzartige Substanz. Dieses Harz wurde mit heißem Alkohol gut zerrieben. Dabei ging ein Teil des Harzes in Lösung; diese wurde ein wenig im Vakuum eingeengt, und dabei kristallisierte ein Körper aus. Schon nach dem zweiten Umkristallisieren zeigte er den Schmelzpunkt des Alanins, aber nur nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol erhielten wir gut übereinstimmende Analysenwerte. Der Körper schmolz in der zugeschmolzenen Kapillare erhitzt, bei 294°[2]), und wurde bei 110° getrocknet.

6,401 mg Substanz . . .	9,512 mg CO_2	4,575 mg H_2O	
5,929 „ „ . . .	8,764 „ „	4,247 „ „	
2,338 „ „ . . .	0,321 ccm N	(15°, 741 mm)	
3,110 „ „ . . .	0,430 „ „	(16°, 741 „)	
Ber. für $C_3H_7NO_2$ (Alanin) .	40,42 Proz. C	7,92 Proz. H	15,73 Proz. N
Gef.	40,54 „ „	7,99 „ „	15,87 „ „
	40,33 „ „	8,02 „ „	15,92 „ „

Bei der Untersuchung im Polarisationsapparat erwies sich der Körper als optisch inaktiv. Es war also das *d, l-Alanin.*

---

[1]) *E. Fischer, Kropp, Stahlschmidt,* Liebigs Ann. **365**, 183.

[2]) *E. Fischer* und *Leuchs,* Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. Berlin **6**, 78, 1902.

Benzoyl-d, l-Alanin.

Zur weiteren Identifizierung des von uns isolierten Alanins haben wir seine Benzoylverbindung[1]) dargestellt.

0,5 g des d, l-Alanins wurden in 5 ccm Wasser gelöst, dann 4 g gepulvertes Natriumbicarbonat und in kleinen Portionen 2,5 g Benzoylchlorid (3 Mol.) hinzugegeben und bei Zimmertemperatur fest geschüttelt. Nach einer Stunde war der Geruch des Benzoylchlorids verschwunden, und als die filtrierte Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert wurde, schied sich ein dicker Kristallbrei ab, welcher aus Benzoesäure und Benzoylalanin bestand. Derselbe wurde nach längerem Stehen filtriert, mit Petroläther zur Entfernung der Benzoesäure gewaschen, getrocknet und wiederholt mit Petroläther ausgekocht. Das zurückgebliebene Benzoylalanin wurde einmal aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 110° getrocknet. Der Schmelzpunkt (162°) war mit dem von *Baum*[2]) angegebenen identisch. Die Stickstoffbestimmung ergab folgende Werte:

2,245 mg Substanz . . .	0,145 ccm N	(18°, 741 mm)
3,117 „ „ . . .	0,203 „ „	(18°, 742 „)
Ber. für $C_{10}H_{11}NO_3$ (Benzoylalanin) . . .		7,26 Proz. N
Gef.		7,38 „ „
		7,46 „ „

Glykokoll.

Das Filtrat von Alanin wurde zu der wässerigen Lösung des im Alkohol unlöslichen Teiles des Harzes dazugegeben und das Ganze mit viel Alkohol versetzt und umgerührt. Es schied sich dabei ein voluminöser Niederschlag ab, worüber später berichtet wird. Das Filtrat davon wurde im Vakuum stark eingeengt. Es schied sich beim Erkalten ein dicker Kristallbrei aus. Er wurde abfiltriert und auf der Zentrifuge mit Alkohol gewaschen. Nach wiederholtem Zentrifugieren erhielten wir einen vollkommen weißen Körper, der aus viel Alkohol umkristallisiert wurde. Der Körper erwies sich nach dem Schmelzpunkt 238° (*Block Maquenne*) und nach der Analyse als Glykokoll. *Curtius*[3]) gibt für den korrigierten Schmelzpunkt 236° an.

7,077 mg Substanz . . .	8,266 mg CO_2	4,368 mg H_2O	
6,384 „ „ . . .	7,427 „ „	3,978 „ „	
2,718 „ „ . . .	0,443 ccm N	(14°, 739 mm)	
2,446 „ „ . . .	0,399 „ „	(16°, 740 „)	
Ber. f. $C_2H_5NO_2$ (Glykokoll):	31,98 Proz. C	6,72 Proz. H	18,67 Proz. N
Gef.	31,86 „ „	6,9 „ „	18,85 „ „
	31,74 „ „	6,97 „ „	18,76 „ „

Die von uns erhaltene Glykokollmenge war sehr gering.

Glykokoll-pikrat.

Um das Glykokoll weiter zu identifizieren, stellten wir sein Pikrat dar. 0,05 g Glykokoll wurden in sehr wenig heißem Wasser gelöst und 0,2 g Pikrinsäure in alkoholischer Lösung hinzugegeben. Beim Erkalten kristallisierte das Glykokollpikrat aus, das sich nach dem Schmelzpunkt (190°)

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **32**, 2454, 1899.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 465, 1885.
[3]) Journ. f. prakt. Chem. (2) **26**, 157.

und Stickstoffgehalt vollkommen identisch mit dem von *Levene*[1]) dargestellten Körper erwies. Der Körper wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

4,031 mg Substanz . . .	0,644 ccm N	(16°, 746 mm)	
2,802 „ „ . . .	0,448 „ „	(17°, 745 „)	
Ber. f. $C_8H_8N_4O_9$ (Glykokollpikrat) . . .			18,43 Proz. N
Gef.			18,53 „ „
			18,45 „ „

Interessant ist die Isolierung des *Glykokolls.*

Während *Karl Spiro*[2]) behauptete, daß Casein kein Glykokoll enthält, hat *E. Fischer*[3]) im Casein das Glykokoll nach seinem bekannten Esterverfahren nachgewiesen.

Dann hat *Z. Skraup*[4]) mitgeteilt, daß Casein unter Umständen Glykokoll enthalten könne, wenigstens erhielt er bei der Hydrolyse einer von *E. Merck* dargestellten Caseinsorte ein Gemisch von Alanin und Glykokoll.

E. Abderhalden und *A. Hunter*[5]) behaupten aber, die Ursache davon sei die, daß *Skraup* kein reines Casein für seine Versuche verwendet habe. Sie behaupten, daß das Glykokoll sich nicht im Casein befinde, sondern in den das Casein begleitenden Proteinen (Albumin, Globulin usw.). Sie entfernten aus Kuhmilch das Casein möglichst sorgfältig und gewannen aus seinem Filtrat durch Kochen das Globulin und Albumin. Die Mischung von beiden wurde der sauren Hydrolyse unterworfen. Durch Einimpfen eines Kriställchens von Glykokollesterchlorhydrat in die erste und zweite Fraktion haben sie das Glykokoll isoliert.

Wir arbeiteten mit einem reinsten dänischen Casein und haben daraus Glykokoll gewonnen. Die Ausbeute war aber sehr gering (wir erhielten aus 500 g Casein 0,1 g Glykokoll). Zu dessen Identifizierung haben wir das Pikrat dargestellt.

Es scheint also, daß der Gehalt des Caseins an Glykokoll von seiner Herstellung abhängt und bei der so geringen Menge ist ja anzunehmen, daß Glykokoll aus einem anderen anhaftenden Eiweißkörper der Milch stammt.

Wie schon früher erwähnt wurde, haben *S. Fränkel* und *P. Jellinek* unter den Produkten der Verdauung Methylamin gefunden. Die Bildungsweise des Methylamins im Verlaufe der protrahierten Trypsinverdauung könnte man sich auf zwei Arten erklären. Entweder durch die Abspaltung einer methylierten Aminosäure und deren weiteren Abbau durch das Trypsin oder durch die Decarboxylierung des Glykokolls. Da die erste Annahme dadurch, daß methylierte Aminosäuren bisher als Spaltungsprodukt des Eiweißes noch nicht aufgefunden und speziell ihr natürliches Vorkommen bei irgendwelchen physiologischen Prozessen noch nicht nachgewiesen werden konnte, unwahrscheinlich erscheint, liegt nunmehr die Möglichkeit nahe, das von *S. Fränkel* und *P. Jellinek* gefundene Methylamin als Decarboxylierungsprodukt des Glykokolls aufzufassen.

---

[1]) Journ. of biol. Chem. **1**, 413, 1906.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 188, 1899.
[3]) Ebendaselbst **33**, 151, 1901.
[4]) Monatshefte f. Chem. **26**, 1343, 1905.
[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 404, 1906.

Die Tatsache, daß wir das Glykokoll gefunden haben, beweist diese Theorie vollständig; es scheint nur, daß die Wirkung der Decarboxylase nicht quantitativ das ganze im Casein enthaltene Glykokoll erfaßt, sondern nur die Hauptmenge.

Die Vermutung, daß ein so weitgehender Abbau von Eiweißkörpern, wie bei uns über Glykokoll bis zum Methylamin möglich und auf fermentative Wirkung zurückzuführen sei, wurde schon in den in unserem Institut vorgenommenen Arbeiten über die Aminosäuren im *Secale cornutum* von *S. Fränkel* und *J. Rainer*[1]) ausgesprochen.

Doch ist weder ein solcher Abbau des Glykokolls, noch die decarboxylierende Wirkung des tryptischen Ferments bei der Verdauung bisher bekannt.

In allen Arbeiten wurde die optisch aktive d-Glutaminsäure gefunden. Die von uns auf eine sehr einfache Weise isolierte Glutaminsäure zeigte *keine* Drehung. Es war also die Razemform die d, l-Glutaminsäure.

Man kann die d, l-Glutaminsäure künstlich aus der optisch aktiven Form erhalten, wenn man die d-Glutaminsäure mit kristallinischem Bariumhydroxyd 9 Stunden im Autoklaven auf 160 bis 170° erhitzt[2]). Es gibt auch andere Verfahren dazu, aber unter den Produkten der Hydrolyse oder der Verdauung des Caseins wurde die d, l-Glutaminsäure noch nicht gefunden.

d, l-Valin.

S. Fränkel und *K. Gallia* haben die Aminoisovaleriansäure im Filtrat von der Phosphorwolframsäurefällung durch fraktionierte Kristallisation gewonnen. Es ist ihnen gelungen, auf diese Weise das d- und das d, l-Valin zu isolieren.

Wir sind nun anders vorgegangen. Wir haben dem alkoholischen Filtrat vom Glykokoll neutrales Bleiacetat in alkoholischer Lösung zugesetzt. Es fiel ein Niederschlag aus, den wir mit Schwefelwasserstoff zerlegten, und beim Einengen des Filtrats vom Schwefelblei kristallisierte die Aminoisovaleriansäure in ihrer Razemform aus.

Das alkoholische Filtrat von Glykokoll wurde mit neutralem Bleiacetat in alkoholischer Lösung versetzt. Die Flüssigkeit trübte sich sofort, und nach zweitägigem Stehen schied sich am Boden des Glases eine weiße Masse ab. Die Flüssigkeit wurde abdekantiert, der ausgefallene Körper in wenig Wasser aufgeschwemmt und Schwefelwasserstoff eingeleitet. Das ausgeschiedene Schwefelblei wurde abfiltriert, das Filtrat durch Luftdurchleiten vom überschüssigen Schwefelwasserstoff befreit und im Vakuum eingeengt. Es kristallisierte ein hellbrauner Körper aus, der, mit Tierkohle gekocht und zweimal aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, sich nach dem Schmelzpunkt in zugeschmolzener Kapillare (296°)[3]) und Stickstoffgehalt als das von *S. Fränkel* und *K. Gallia* gefundene Valin erwies. Die Substanz zeigte keine optische Aktivität.

3,630 mg Substanz	. . . 0,383 ccm N	(15°, 742 mm)
3,386 „ „	. . . 0,355 „ „	(16°, 742 „)
Ber. für $C_5H_{11}NO_2$ (Valin)	. . . . . .	11,96 Proz. N
Gef.	. . . .	12,21 „ „
		12,09 „ „

[1]) Diese Zeitschr. 74, 167, 1916.
[2]) *E. Fischer*, *Kropp* und *Stahlschmidt*, Liebigs Ann. 260, 123.
[3]) *Slimmer*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 401, 1902.

Alle Körper, die bis jetzt bei den oben erwähnten Arbeiten nachgewiesen wurden, sind in der Weise isoliert worden, daß man das Filtrat des Verdauungsgemisches mit Schwefelsäure und Quecksilbersulfatlösung versetzte und den entstehenden Niederschlag und das Filtrat davon separat verarbeitete. Da dieses Verfahren vorläufig keine weiteren Resultate zeitigte, wichen wir von ihm in der Weise ab, daß wir den festen Rückstand der Verdauung mit Wasser und das Filtrat mit Alkohol statt mit Quecksilbersulfat verarbeiteten. Es ist uns dabei gelungen, einige Körper zu isolieren, welche die schon früher erwähnten Funktionen des tryptischen Ferments vollkommen beweisen.

In dem oben beschriebenen alkoholischen Filtrat wird zuerst die Glutaminsäure und das Oxyprolin isoliert. Das zurückgebliebene, von diesen Verbindungen befreite Filtrat wurde mit viel Alkohol versetzt, von der Fällung abgeschieden und das Filtrat im Vakuum stark eingeengt. Beim Erkalten entstand eine sirupöse Flüssigkeit. Dieser Sirup wurde mit heißem Alkohol gut verrieben. Dabei ging ein Teil vom Sirup in Lösung. Diese Lösung wurde im Valkuum konzentriert, worauf Kristalle sich ausschieden, die als *d, l-Alanin* erkannt wurden.

d, l-Alanin.

Das von *E. Fischer* und *Z. Skraup* isolierte Alanin erwies sich als optisch aktiv, und zwar als das d-Alanin. Der von uns auf viel einfachere Weise isolierte Körper erwies sich bei der Polarisation als optisch aktiv. Es war also das d, l-Alanin.

In den Produkten der Hydrolyse oder der Verdauung des Caseins wurde es aber noch nicht gefunden.

Zu seiner weiteren Identifizierung haben wir seine Benzoylverbindung dargestellt, die sich vollkommen identisch mit dem von *E. Fischer*[1]) dargestellten Benzoyl-d, l-Alanin erwies.

Das Filtrat vom Alanin wurde nun zu der wässerigen Lösung des in Alkohol unlöslichen Teiles dazugegeben und das Ganze mit viel Alkohol versetzt und stark umgerührt. Dabei schied sich ein voluminöser Niederschlag ab, von welchem abfiltriert wurde.

d, l-Serin.

Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum eingeengt und mit Alkohol gefällt, der entstandene Niederschlag wurde mit Alkohol mehrmals gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden neuerlich im Vakuum eingeengt bis zur beginnenden Kristallisation. Nach dem Erkalten wurden die Kristalle scharf abgesaugt und aus heißem Wasser bei Zusatz von Tierkohle umkristallisiert, bis der Schmelzpunkt 240° C konstant blieb. Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz wurde der Elementaranalyse unterworfen.

7,674 mg	Substanz gaben	9,651 mg CO_2 und	4,651 mg H_2O
8,135 ,,	,, ,,	10,256 ,, ,, ,,	4,806 ,, ,,
4,143 ,,	,, ,,	0,471 ccm V	(*p* 750 mm, *t* 15° C)
3,466 ,,	,, ,,	0,396 ,, ,,	(*p* 750 ,, *t* 15° C)

Ber. für $C_3H_7NO_3$:	34,26 Proz. C	6,72 Proz. H	13,34 Proz. N
Gef.	34,31 ,, ,,	6,78 ,, ,,	13,30 ,, ,,
	34,39 ,, ,,	6,61 ,, ,,	13,36 ,, ,,

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **32**, 2454, 1890.

Die Elementaranalyse ergibt also Werte, die genau für die oben aufgestellte Formel stimmen, welche die Formel des Serins ist. Auch der Schmelzpunkt stimmt mit dem von *E. Fischer*[1]) beschriebenen überein. Es war also anzunehmen, daß hier das Serin vorliegt.

Bei der Untersuchung auf das optische Drehungsvermögen erwies sich der Körper als *optisch inaktiv.*

β-Naphthalinsulfo-serin.

Zur genauen Identifizierung haben wir auch die β-Naphthalinsulfoverbindung dargestellt. Zwei Moleküle β-Naphthalinsulfochlorid in Äther gelöst, wurden mit einem Molekül der Substanz in der berechneten Menge N-Natronlauge aufgelöst und mit der Schüttelmaschine geschüttelt. In Intervallen von 1 bis 1½ Stunden wurde noch dreimal die gleiche Menge N-Natronlauge zugefügt. Das Reaktionsprodukt wurde dann von der ätherischen Schicht getrennt und abfiltriert. Das alkalische Filtrat wurde mit Salzsäure versetzt, worauf ein amorpher Körper sich ausschied. Dieser wurde nochmals in verdünntem Alkali gelöst und mit Salzsäure bis zur Trübung versetzt. Nach kurzer Zeit schieden sich Kristalle aus, die, aus Wasser umkristallisiert, bei 210° C schmolzen. Dieser Schmelzpunkt stimmt mit dem in der Literatur angegebenen überein[2]).

Die Stickstoffbestimmung ergab Werte, die auf das β-Naphthalinsulfoserin genau stimmten.

3,268 mg Substanz gaben 0,136 ccm V (750 mm, 15° C)
3,724 „ „ „ 0,157 „ „ (750 „ 14° C)

Ber. für $C_{13}H_{13}NSO_5$ . . . . . 4,74 Proz. N
Gef. . . . . 4,86 „ „ ; 4,94 „ „

Somit war es festgestellt, daß hier tatsächlich das d, l-Serin vorliegt.

l-Asparaginsäure.

Der sirupöse Niederschlag, in Wasser aufgelöst, wurde mit Sublimat gefällt so lange, bis das Filtrat auf neuerlichen Zusatz von Sublimat keine Fällung mehr gab. Vom Niederschlage wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff gesättigt; vom ausgeschiedenen Quecksilbersulfid wurde abfiltriert und mehreremal mit Wasser nachgewaschen, der überschüssige Schwefelwasserstoff mit Kohlensäure verjagt. Um die aus dem Sublimat stammende Salzsäure zu entfernen, haben wir das Filtrat mit Bleiglätte versetzt und vom ausgefallenen Bleichlorid abfiltriert. Um in Lösung befindliches Blei zu entfernen, wurde neuerdings Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet, vom ausgeschiedenen Schwefelblei wurde abfiltriert. Nun wurde der in der Lösung befindliche Überschuß an Schwefelwasserstoff mittels Luft an der Wasserstrahlpumpe verjagt. Die gefärbte Flüssigkeit wurde im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt. Die abgesaugten Kristalle wurden aus Wasser mehreremal umkristallisiert, bis der Zersetzungspunkt nicht mehr anstieg. Die über

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 156, 1903.
[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **35**, 3784, 1902.

Schwefelsäure getrocknete Substanz wurde der Elementaranalyse unterworfen.

7,982 mg	Substanz	gaben	10,593 mg CO_2	und 3,697 mg H_2O
7,204 „	„	„	9,564 „	„ „ 3,462 „ „
4,209 „	„	„	0,381 ccm V	(p 750 mm, t 13° C)
3,154 „	„	„	0,282 „ „	(p 750 „ t 12° C)

Ber. für $C_4H_7NO_4$ (Asparaginsäure)	36,07 Proz. C	5,30 Proz. H	10,53 Proz. N
Gef.	36,20 „ „	5,18 „ „	10,66 „ „
	36,22 „ „	5,37 „ „	10,57 „ „

Der Zersetzungspunkt bei 270° C in der zugeschmolzenen Kapillare stimmt mit dem in der Literatur angegebenen überein[1]).

Bei der Untersuchung auf das optische Drehungsvermögen erwies sich diese Substanz als linksdrehend. Eine 1,5proz. Lösung in 10proz. Salzsäure drehte im 1-dm-Rohr die D-Linie 0,08° nach rechts, $[\alpha]_D^{19} = + 5,33°$. Die von *E. Fischer*[2]) beschriebene Asparaginsäure, gewonnen bei der salzsauren Hydrolyse des Caseins, drehte $[\alpha]_D = + 7,63°$ in 10proz. salzsaurer Lösung.

Leucin-anhydrid.

Der Quecksilberniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom ausgeschiedenen Quecksilbersulfid wurde abfiltriert, das Filtrat nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs mit Bleiglätte versetzt, um die freie Salzsäure zu entfernen. Vom ausgefallenen Chlorblei wurde filtriert und zur Entfernung des in Lösung gebliebenen Bleies neuerlich Schwefelwasserstoff eingeleitet. Vom Schwefelblei wurde abfiltriert. Dann wurde Schwefelwasserstoff aus dem Filtrat mittels Luft verjagt. Die Lösung wurde im Vakuum eingeengt, worauf ein fester Körper hinterblieb, der sich als amorph und in Alkohol unlöslich erwies. Dieser wurde aus wenig Wasser mehrmals umkristallisiert, bis der Schmelzpunkt bei 255° C konstant blieb. Die über Schwefelsäure getrocknete Substanz wurde der Analyse unterworfen.

8,624 mg	Substanz	gaben	18,672 mg CO_2	und 7,664 mg H_2O
7,284 „	„	„	15,787 „	„ „ 6,426 „ „
4,218 „	„	„	0,417 ccm V	(p 750 mm, t 13° C)
4,769 „	„	„	0,474 „ „	(p 759 „ t 17° C)

Ber. für $C_{12}H_{24}N_2O_3$	58,96 Proz. C	9,90 Proz. H	11,74 Proz. N
Gef.	59,06 „ „	9,94 „ „	11,65 „ „
	59,13 „ „	9,87 „ „	11,69 „ „

Die Analysenwerte stimmen also für die oben aufgestellte Formel, welche für das Anhydrid des Leucins paßt. Es war nun noch festzustellen, ob hier ein unter Wasserabspaltung beider Carboxylgruppen zustande gekommenes Anhydrid oder ein peptidartig gebundenes Anhydrid vorliegt. Durch die Bestimmung der Aminogruppen mittels der Formoltitration nach *Sörensen* wurde festgestellt, daß dieser Körper keine freien Carboxylgruppen enthält.

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 28, 1632, 1895.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 171, 1901.

Formol-titration.

0,1312 g Substanz wurden in 20 ccm n/10 Salzsäure aufgelöst und mit 10 ccm einer vorher frisch bereiteten Formaldehydlösung versetzt. Beim Zurücktitrieren mit n/10 Lauge haben wir gar keinen Überschuß an Lauge verbraucht. Hiermit ist bewiesen, daß die Substanz tatsächlich keine freien Carboxylgruppen enthält.

Auf diese Weise konnten wir feststellen, daß das vorliegende Leucinanhydrid in seinen Eigenschaften identisch ist mit dem in der Einleitung erwähnten, von *Destren* beschriebenen, unter Wasseraustritt beider Carboxylgruppen entstandenem.

Bei der Untersuchung auf das optische Drehungsvermögen erwies sich diese Substanz als rechtsdrehend. Eine 0,13proz. wässerige Lösung im 1-dm-Rohr drehte im großen *Landolt-Lippich*schen Halbschattenapparat die *D*-Linie 0,1 nach rechts. $[\alpha]_D^{16} = +7,5^0$. Nach einer Woche ist das Drehungsvermögen um ein wenig gesunken. Dieselbe Lösung drehte nunmehr 0,09 nach rechts, $[\alpha]_D^{16} = +6,15^0$.

Eine jodometrische Bestimmung des Natriums.

Von

M. Bálint und H. Petow.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 21. Dezember 1923.)

Durch das Erscheinen der Arbeit von *Hans Müller* in der Helv. Chim. Acta 6, 1152, 1923, sehen wir uns veranlaßt, einiges über noch nicht abgeschlossene Versuche mitzuteilen. Im Sommer 1923 haben wir eine Methode zur Bestimmung von Na ausgearbeitet, die Ende Juli in fast derselben Form vorlag, wie *H. Müller* sie jetzt veröffentlicht hat. Es wurden auch Analysen für einige Arbeiten zum Teil aus dem Laboratorium von Prof. *Rona*, zum Teil aus unserer Klinik damit gemacht. Diese Arbeiten werden demnächst erscheinen.

Inzwischen traten Unstimmigkeiten zutage, die uns veranlaßten, die ganze Methode noch einmal systematisch durchzuarbeiten, da sie in der damaligen Form — d. h. in der Form, wie sie von *H. Müller* publiziert wurde — zwei Arten von Fehlern aufwies. Erstens war die Streuung zu groß, d. h. die Einzelwerte der Parallelbestimmungen lagen zu weit auseinander (bis zu 3 Proz.), und zweitens war auch der Mittelwert hin und wieder unerklärlicherweise zu hoch oder zu niedrig (bis ± 5 bis 6 Proz.) geraten.

Die Untersuchung deckte folgende Fehlerquellen auf:

1. Die Glassorte. Die im Laboratorium allgemein üblichen Zentrifugiergläser eignen sich nicht für die Bestimmung, da sie dauernd Alkali an das Reagens abgeben, d. h. von ihm angegriffen werden. Der hierdurch verursachte Fehler ist stark wechselnd, je nach der Vorgeschichte des Glases, ist aber immer positiv und kann bis 3 bis 4 Proz. erreichen.

2. Das Waschwasser. 30proz. Alkohol, sowohl volum- als auch gewichtsprozentig, ist unbrauchbar, da er eine ziemlich hohe Löslichkeit für das Natriumpyrostibiat besitzt, deren untere Grenze nach unseren vorläufigen Versuchen etwa 0,004 mg Na pro Kubikzentimeter Wasch-

alkohol ist. Das Auswaschen bedingt also zu niedrige Werte, Größenordnung 1 bis 3 Proz.

3. Das Reagens. Eine Kritik desselben kurz zu geben, ist schwer, da mehrere Faktoren mitspielen. Im allgemeinen kann gesagt werden, daß sein Sicherheitsfaktor zu klein ist, d. h. unter normalen Verhältnissen gibt es normale Werte, aber schon verhältnismäßig kleine Abweichungen des Mediums veranlassen, wenn sie in bestimmten Richtungen liegen, zu große Fehler, die durch passende Herstellung des Reagens vermieden werden können. Die Fehler sind meistens negativ und betragen je nach den Verhältnissen 1 bis 5 und sogar mehr Prozent.

Die Größenordnung der übrigen Fehlerquellen ist etwa eine Zehnerpotenz kleiner, so daß sie in dieser Mitteilung übergangen werden sollen. Wir bemerken noch, daß immer 1 ccm n/20 Kochsalzlösung bestimmt wurde im Gegensatz zu *H. Müller*, der mit n/100 Lösung arbeitete, so daß alle oben diskutierten Fehler bei ihm noch schwerer ins Gewicht fallen müßten.

Unsere Arbeit wird demnächst ausführlich erscheinen.

Einwirkung von Kaliumjodid auf die Verzuckerung der Stärke durch verschiedene Amylasen.

Von

Oskar Holmbergh.

(Aus dem biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 22. Dezember 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung[1]) konnte ich zeigen, wie die Fähigkeit der Leberamylase, Stärke zu reduzierenden Substanzen zu hydrolysieren, durch Zusatz von Jodiden zur Reaktionsmischung gehemmt, die Bildung von Erythrodextrinen beschleunigt wird. Da dieser Umstand deutlich auf die Existenz von zwei stärkespaltenden Enzymen in der Leberdiastase hinweist, und weil es außerdem von Interesse war, zu erfahren, wie die übrigen leicht zugänglichen Amylasen sich zu den Jodiden verhalten, habe ich meine früheren Beobachtungen mit Versuchen an Malz-, Speichel- und Pankreasdiastase ergänzt und teile die Resultate hier mit.

Ferner habe ich den Abbau der Stärke durch Leberdiastase in jodkaliumhaltiger Substratlösung so weit verlaufen lassen, bis keine Färbung durch Jod mehr erhalten wurde, und konnte nachweisen, daß die prozentische Menge gebildeter reduzierender Abbauprodukte in konzentrierteren Jodkaliumlösungen beträchtlich vermindert wird. Studiert man das Auftreten der Dextrine bei der Stärkehydrolyse, so tritt immer die Schwierigkeit auf, die Dextrine von reduzierenden Substanzen zu befreien. Deshalb ist es sicher von Wert, die bezüglich des Einflusses von Jodkalium gefundenen Tatsachen weiter zu verfolgen, was in diesem Laboratorium geschehen soll.

1. Das Verhalten der Malzamylase zu verschiedenen KJ-Normalitäten.

Die Temperatur bei diesen und allen folgenden Versuchen war $37^0 \pm 0,1$; sie wurde im elektrisch geheizten Wasserthermostaten konstant gehalten.

Die Reaktionsmischungen hatten folgende Zusammensetzung: 10 ccm Phosphatpuffer, 25 ccm 2proz. Stärke nach *Lintner*, 1 ccm

[1]) *O. Holmbergh*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **132**, 1, 1924.

verdünnter dialysierter Malzauszug, Wasser und KJ-Lösungen bis zu 50 ccm. Um $k = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ zu erhalten, wurden nach verschiedenen Zeiten Proben zu 10 ccm herausgenommen, in welchen die Reduktionsfähigkeit gemäß der Methode von *Bertrand* bestimmt wurde. $p_H = 5{,}1$.

Tabelle I.

KJ-Konzentration	Ohne Salz	n/1000	n/100	n/10
K (Mittel)	0,004 80	0,000 38	0,000 14	0,000 10

Aus Tabelle I ist zu ersehen, daß die Verzuckerungsfähigkeit gehemmt wird; während der 20stündigen Versuchszeit nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ununterbrochen ab, und in n/100 KJ wurde nach dieser Zeit eine vollständige Vergiftung konstatiert. Da die Vergiftung der Amylasen in diesem Institut eingehend studiert wird[1]), bin ich nicht näher auf diese Inaktivierung eingegangen.

2. Das Verhalten der Speichelamylase zu verschiedenen KJ-Normalitäten.

Die Reaktionsmischungen enthielten 10 ccm Phosphatpuffer, 25 ccm 2proz. Stärke, 1 ccm verdünnten Speichel (3 ccm zu 10 ccm Wasser), KJ-Lösung und Wasser bis zu 50 ccm. $p_H = 6{,}5$. Jede herausgenommene Probe 10 ccm.

Tabelle II.

KJ-Konzentration	Ohne Salz	n/100	n/10	n/2	1 n
K (Mittel)	0,0053	0,0076	0,0096	0,0076	0,0048

In 2 n KJ tritt eine Hemmung ein, die nahezu vollständig und spontan ist. *Wohlgemuth*[2]) hat früher gezeigt, daß die Erythrodextrinbildung durch Speichelamylase von Jodiden aktiviert wird, und wie aus obenstehendem hervorgeht, gilt dies auch von der Bildung reduzierender Substanzen.

3. Die Pankreasamylasewirkung bei verschiedenen KJ-Normalitäten.

Die Reaktionsmischungen von derselben Zusammensetzung wie in früheren Versuchen. $p_H = 6{,}9$. Die Enzymlösungen sind verdünnte Glycerinauszüge aus aceton- und ätherbehandeltem Pankreas.

Tabelle III.

KJ-Konzentration	Ohne Salz	n/100	n/10	n/2	1,2 n	1,4 n
K (Mittel) . .	0,0061	0,0134	0,0156	0,0157	0,0150	0,0132

[1]) *Urban Olsson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **117**, 91, 1921; **119**, 1, 1922; **126**, 29, 1923. — [2]) *Wohlgemuth*, diese Zeitschr. **9**, 10, 36, 1908.

Wie man in Tabelle III findet, wird die Wirkung der Pankreasamylase durch Kaliumjodidzusatz um etwa 150 Proz. erhöht. Auch in 2 n KJ-Lösung tritt eine Aktivierung ein. Hier wird aber das Enzym nach etwa 25 Minuten inaktiviert und die nach Verlauf dieser Zeit zugesetzte Stärkelösung (2 n KJ) wird nicht verzuckert. Die Vergiftung ist doch eine vorübergehende, da, falls die Amylase während einer Stunde mit 2 n KJ-Lösung behandelt und danach in eine Stärkelösung übergeführt wird, kein besonderer Aktivitätsverlust bemerkt wird.

Es geht folglich aus diesen Versuchen hervor, daß Pankreas- und Speichelamylasen sich in ihrem Verhalten zu Kaliumjodid von Leberamylase unterscheiden. Der Stellung der Leber und des Pankreas im Organismus zufolge liegt es nahe, zu vermuten, daß ihre Amylasen identisch seien. Es gibt aber weder phylogenetisch noch ontogenetisch Beweise dafür, daß diese Organe bei Vertebraten homolog sind.

Das Kaliumjodid hat bei der Pankreasamylasewirkung eine positive Verschiebung des Schlußwertes der Verzuckerung gezeigt. Aus mehreren Fällen, wo dieses wahrgenommen wurde, werden hier Zahlen aus einer Probe mit n/100 KJ angeführt. Die Reaktionsmischung war die gleiche wie früher; $p_H = 6,9$. Die Angaben beziehen sich auf 10 ccm der Probe.

Tabelle IV.

Reaktionsdauer Stunden	mg Maltose	
	ohne KJ	mit KJ
0,5	29,3	59,3
1,25	50,1	61,7
18,0	59,9	66,7

Wie aus den oben angeführten Versuchen hervorgeht, ist die partielle Hemmung von Malz-, Speichel- und Pankreasamylasen bei Behandlung mit KJ-Lösungen nicht erhalten worden, und ich habe deshalb einige Versuche mit Leberamylase gemacht, um näher zu untersuchen, in welchem Grade die Bildung von reduzierenden Substanzen bei KJ-Zusatz zu den Reaktionsmischungen vermindert wird.

Meine erste Aufgabe war dann, jene Menge reduzierender Substanz zu bestimmen, die unter normalen Verhältnissen gebildet wird, wenn die Abbauprodukte mit Jod keine Färbung mehr geben. Wird die Reaktionsgeschwindigkeit nach *Wohlgemuth*[1]) gemessen, so findet man eine achtfache Aktivierung der Dextrinase durch geeignete Mengen von Kaliumjodid. Läßt man dagegen die Reaktion so lange fortgehen, bis alle Stärke in Achroodextrine übergeführt ist, so wird die Aktivierung nicht in solchem Grade begünstigt, mit Ausnahme von schwachen KJ-Normalitäten.

[1]) *Wohlgemuth*, diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

v. Euler und *Svanberg*[1]) haben bei Malzamylase gefunden, daß, wenn die gelbe Jodfarbe unverändert bleibt, etwa 62 Proz. der maximalen theoretischen Menge Maltose aus der Stärke gebildet sind. Bei Leberamylase hat es sich gezeigt, daß diese Farbe nicht verändert wird, wenn etwa 65 Proz. der theoretischen Menge Maltose gebildet sind.

Die Leberamylaselösungen aber, die ich benutzt habe, enthalten Maltase, wie unten erwähnt wird. Da aber die Wirkung dieses Enzyms klein ist, wie in folgender Tabelle VI zu ersehen ist, habe ich die erhaltenen reduzierenden Substanzen als Maltose statt Glucose berechnet. Die Enzymlösungen sind wie folgt hergestellt:

10 g aceton- und ätherbehandeltes getrocknetes Lebergewebe wurden während 12 Stunden mit 100 ccm 25proz. Alkohol extrahiert, wonach bei der Temperatur 0° das Filtrat zu dem doppelten Volumen Aceton hinzugegossen wurde. Die erhaltene Fällung wurde abgesaugt und in 50 ccm 87proz. Glycerin gelöst; von dieser Lösung sind in der Regel zu jeder Probe 2 ccm benutzt worden. Die Reaktionsmischungen, in mit Gummistopfen geschlossenen Probierrohren, hatten folgende Zusammensetzung: 2,5 ccm 2proz. Stärke, 1 ccm 4proz. Phosphatpuffer, 2 ccm Enzymlösung, KJ-Lösung und Wasser bis auf 10 ccm. Außerdem enthielt jedes Rohr drei Tropfen Toluol. In Tabelle V sind die Mengen Maltose angegeben, die in den bzw. Rohren gebildet worden waren, wenn keine Färbung mehr mit Jod erhalten wurde und ferner die Reaktionszeiten.

Tabelle V.

KJ-Konzentration	Ohne Salz	n/10	n/2	1 n	1,5 n	2 n
Maltose mg .	34,1	28,7	25,6	23,8	19,5	21,2
Reaktionszeit Stunden . .	49,5	8,5	9,0	11,25	22,5	48,0

Tabelle V und Abb. 1 zeigen deutlich, wie die gebildete Menge reduzierender Substanz in stärkeren KJ-Lösungen vermindert wird. In 2 n Lösung ist jedoch ein höherer Wert als in der unmittelbar vorangehenden Probe (mit 1,5 n KJ) zu verzeichnen. Dies läßt sich aber durch die lange Reaktionszeit und damit folgende größere Maltasewirkung erklären. Wie ich früher[2]) gezeigt habe, ist die Maltasewirkung in schwachen Maltoselösungen am größten, und man konnte daher

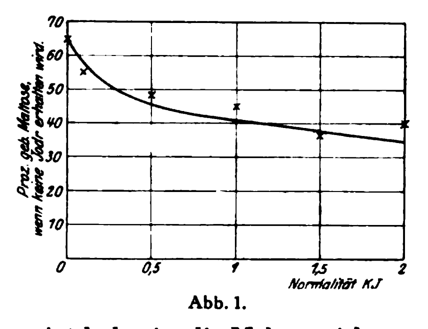


Abb. 1.

[1]) *v. Euler* und *Svanberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **112**, 191, 1920/21.
[2]) *Holmbergh*, Svenska Vet. Ak. Arkiv. f. Kemi 8, Nr. 33, 1, 1923.

(besonders wegen der langen Reaktionsdauer) den Wert, der in 2 n KJ-Lösung erhalten ist, als Glucose berechnen und dadurch etwa 20 Proz. der theoretischen Menge reduzierender Produkte bekommen, wenn jede Färbung mit Jod ausbleibt.

Daß die Wirkung der Maltase durch KJ-Zusatz unverändert bleibt, ist bewiesen worden und geht z. B. aus folgenden Ziffern hervor.

Tabelle VI.

(Reaktionsmischungen: 10 ccm Phosphatpuffer, 10 ccm 2proz. Maltoselösung, 2 ccm Enzym, Wasser und Kaliumjodid bis auf 30 ccm. $p_H = 6{,}5$. Die Angaben entsprechen 5 ccm der Probe.)

Reaktionsdauer Minuten	Ohne Salz mg Cu	1 n-KJ mg Cu
0	37,2	37,2
60	39,2	38,2
280	40,2	41,2

In einem Versuche mit 10 ccm Phosphatpuffer, 50 ccm 3proz. Stärke, 30 ccm 5 n KJ und 10 ccm Enzymlösung waren nach 4 Tagen, wenn keine Jodreaktion erhalten wurde, 32,5 Proz. der theoretisch möglichen Menge von Maltose gebildet worden. Berechnet man diese reduzierenden Stoffe als Glucose, so ist nur etwa 16 Proz. der Stärke in reduzierende Substanzen abgebaut.

Die Achroodextrine wurden zweimal in 80proz. Alkohol gefällt und mit 95proz. Alkohol gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum über P_2O_5 war ihr Reduktionsvermögen 3,2 Proz. von demjenigen der Maltose.

Wie *Sherman* u. *Thomas*[1]) zuerst gezeigt haben, wird die verzuckernde Wirkung der Amylase, gemessen durch Reduktion, und die stärkespaltende, gemessen durch die Methode *Wohlgemuths* (l. c.), von äußeren Umständen, wie Acidität und Temperatur, verschieden beeinflußt. Durch Variation der Wasserstoffionenkonzentration, Kaliumjodid- und Substratkonzentration, sowie der Temperatur ist zu vermuten, daß es gelingen wird, eine Methode auszuarbeiten, durch welche die Stärke auf rein enzymatische Weise in Achroodextrine abgebaut wird, ohne daß dabei reduzierende Produkte erhalten werden.

[1]) *Sherman* und *Thomas*, Journ. Amer. Chem. Soc. 37, 623, 1915.

Der Stoffwechsel der Benzoesäure im menschlichen Organismus.

Von

J. Neuberg.

(Aus dem pathologischen Institut der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1923.)

Einleitung.

Mit nachfolgendem Beitrag haben wir versucht, aufs neue an die Lösung des Hippursäureproblems heranzutreten.

Normaliter wird die Hippursäure bei gemischter Nahrung im menschlichen Urin in Quantitäten von 200 bis 1200 mg pro Liter und Tag vorgefunden. *Bunge* und *Schmiedeberg* (43) haben nachgewiesen, daß die Synthese der Hippursäure in der Niere stattfindet. *Kingsbury* und *Bell* (31) behaupteten dagegen, daß diese Synthese auch in anderen Organen vor sich gehen kann. Auf Grund der von uns (54) wiederholten Experimente beider Richtungen, müssen wir uns auf seiten *Bunges* und *Schmiedebergs* stellen; zu gleicher Zeit haben wir den Nachweis erbracht, daß die Synthese der Hippursäure *beim Menschen* ebenfalls in der Niere stattfindet. Der größte Teil der Hippursäure im menschlichen Urin wird von Früchten und Gemüsen geliefert, welche viel Benzoesäure enthalten; nur ein sehr kleiner Teil entsteht durch die Fäulnis von Eiweiß, wobei nach *Salkowski* (1) Phenylpropionsäure und zwar nach *Baumann* (52) aus Phenylalanin entsteht, welche beide zu Benzoesäure oxydiert werden und gepaart an Glykokoll als Hippursäure im Urin auftreten.

Merkwürdigerweise braucht man kein Glykokoll zuzuführen; gleichviel in welcher Menge Benzoesäure verabfolgt wird, stets findet man fast alle Benzoesäure als Hippursäure wieder. Offenbar kann im Stoffwechsel nötigenfalls ein größeres Quantum Glykokoll auftreten. Die Benzoesäure ist dann der Reiz, unter dessen Einfluß ein Teil der Baustoffe des Eiweißes nicht zu Harnstoff abgebaut wird (44), sondern in Form von Glykokoll für die Bindung der Benzoesäure reserviert wird. Es erhebt sich die Frage, ob Benzoesäure nur als Hippursäure ausgeschieden wird. Unseres Erachtens gibt es noch mehrere Modalitäten:

1. Kann freie Benzoesäure im Urin vorkommen?
2. Kann Benzoesäure, auch an andere Stoffe als Glykokoll gepaart, im Urin vorkommen?

Zu 1. Die Hippursäure ist ein ziemlich beständiger Stoff, sie wird jedoch in alkalischem, Bakterien und Eiweiß enthaltendem Urin teilweise gespalten [*van de Velde* und *Stokvis* (32), *Seo* (25)], so daß es den Anschein hat, als ob freie Benzoesäure im Urin vorkommt.

Man kann dieser Spaltung dadurch vorbeugen, daß man entweder den enteiweißten Urin sauer macht, oder bakterizide Stoffe, wie Chloroform, Toluol, Thymol usw., hinzufügt.

Wir wählten zu unseren Versuchen entweder + 25 ccm Chloroform-Toluol (1 : 1) oder konzentrierte Salpetersäure (2 Proz. des Volumens) und konnten daher diesen Urin in der Kälte aufbewahren.

Zu 2. Wenn man einen Patienten benzoesaures Natrium gebrauchen läßt und Maßnahmen trifft, daß der frisch ausgeschiedene Harn sauer reagiert, sowie weder Eiweiß noch Bakterien enthält, findet man alsdann im Harn nur Benzoesäure an Glykokoll gepaart oder kommen für diese Bindung noch andere Stoffe in Betracht?

Schon *Salkowski* (1) und *Kobert* (4) vermuteten, daß das applizierte benzoesaure Natrium teilweise an Glykokoll und teilweise an einen anderen Stoff gepaart im Harn auftritt (Glucosid?). *Magnus Levy* (6) fand bei Schafen, daß ein Teil des applizierten benzoesauren Natriums der Glykokollpaarung entzogen wurde und als Benzoeglucuronsäure im Harne vorkommt. Im Gegensatz hierzu meinten *Dakin* (13) und *Lewinski* (11) (letztgenannter gab seinen Patienten jede Stunde 1 bis 2 g benzoesaures Natrium bis zu einem Maximum von 10 bis 20 g), daß beim Menschen die applizierten Dosen quantitativ als Hippursäure im Urin erscheinen.

Wir werden uns nunmehr im nachfolgenden bemühen, die Lösung der verschiedenen hier erwähnten Fragen zu fördern.

1. Kommt freie Benzoesäure im Harn vor?

Mit der Lösung dieser Frage haben sich schon viele Autoren befaßt: auf der einen Seite stehen *Salkowski* (1), *Jaarsveld* und *Stokvis* (18), *Brugsch* (12), *Tsuchiya* (14) und *Wiechowski* (9), welche meinten, daß freie Benzoesäure im menschlichen Harn vorhanden ist, auf der anderen Seite befinden sich *Dakin* (13), *Lewinski* (11) und *Lewis* (23), welche sich dieser Meinung nicht anschließen konnten, da sie niemals freie Benzoesäure im menschlichen Harn vorfanden.

Um die Lösung dieser Frage zu fördern, gebrauchten wir:

A. Normalen Harn.

B. Harn von Patienten, welchen 15 g benzoesaures Natrium zugeführt worden war.

C. Harn von Patienten mit verzögerter Hippursäureausscheidung, welchen 15 g benzoesaures Natrium zugeführt worden war.

A. Wir fangen den frisch entleerten Harn eines normalen Menschen mit gemischter Diät in konzentrierter Salpetersäure (2 Proz. des Volumens) auf. Der Harn wird nötigenfalls enteiweißt; 50 ccm des angesäuerten Harns werden mit Petroläther (K.-P. 28 bis 40°) sechsmal ausgeschüttelt und der Petroläther alsdann verdunstet.

Bekanntlich geht Hippursäure nicht, Benzoesäure dagegen wohl in Petroläther über.

Wenn also nach dem Verdunsten noch Kristalle zurückbleiben, so können diese nicht von Hippursäure, sondern nur von Benzoesäure (bzw. anderen Stoffen) herrühren.

Wir fanden jedoch niemals Kristalle von Benzoesäure, sondern lediglich ein bräunliches Residuum, welches nach Auflösung und Titrieren mit Lauge nur Spuren von Säure aufwies, mit anderen Worten: *praktisch gesprochen kommt freie Benzoesäure im normalen Harn nicht vor.*

B. Betrachten wir nunmehr die Resultate einer größeren Dosierung von benzoesaurem Natrium (10 bis 15 g) beim Menschen mit normalen Nieren und bei gemischter Nahrung. Wird benzoesaures Natrium im menschlichen Organismus vollständig in Hippursäure umgesetzt oder entzieht sich ein Teil dieser Substanz der Glykokollpaarung, um ungebunden im Urin vorzukommen? (Auf Grund der schnellen Ausscheidung der zugeführten Benzoesäure haben wir den Harn meistens während 3 × 8 Stunden, vereinzelt 2 × 12 oder auch 4 × 6 Stunden aufgefangen.)

Ein Patient mit normalen Nieren bekommt 3 × 5 g benzoesaures Natrium (jede Stunde 5 g). Der Harn wird während 2 × 12 Stunden aufgefangen. 25 ccm Harn der ersten 12 Stunden werden angesäuert, mit 6 × 50 ccm Petroläther (K.-P. 28 bis 40°) ausgeschüttelt und dieser im Luftstrom derart verdunstet, daß sich eine Eiskruste um den Kolben formt [Methode von *Wiechowski* (9)]. Dieselbe Manipulation wiederholten wir mit dem Harn der zweiten 12 Stunden und konstatierten, daß weder im Harn der ersten 12 Stunden, noch in jenem der zweiten 12 Stunden, nach Verdunstung des Petroläthers, Kristalle von Benzoesäure übrigblieben, indem die Titration nur Spuren von Säure aufwies. Ähnliche Versuche wiederholten wir achtmal und stets mit demselben Resultat.

Es zeigt sich also, *daß nach Zuführung von 10 bis 15 g benzoesauren Natriums, praktisch gesprochen, keine freie Benzoesäure im Harn von Menschen mit normalen Nieren vorkommt.*

C. Es bleibt nun übrig, die vorstehenden Versuche nachzuprüfen bei Menschen, welche eine sehr langsame Hippursäureausscheidung haben, d. h. bei Patienten mit kranken Nieren und verzögerter Stickstoffausscheidung (53). *Auch hier ergab sich, daß keine freie Benzoesäure im Harn vorkommt, selbst nicht, wenn die Hippursäureausscheidung bedeutend verzögert war.* (Bei einem Patienten, dem wir 15 g benzoesaures Natrium zuführten, waren nach 3 × 12 Stunden nur etwa $6\frac{1}{2}$ g

Hippursäure ausgeschieden, während beim normalen Menschen alle Hippursäure bereits in den ersten 12 Stunden ausgeschieden wird.)

Zusammenfassend ergibt sich, daß freie Benzoesäure weder im Harn von normalen Menschen (gemischte Nahrung), noch auch im Harn von Patienten mit Schrumpfnieren, welchen 10 bis 15 g Benzoesäure verabfolgt worden sind, vorkommt.

II. Kann Benzoesäure an andere Stoffe als Glykokoll gepaart im Harn ausgeschieden werden?

Wegen der schnellen Ausscheidung der zugeführten Benzoesäure [wir fanden 76 bis 87½ Proz. bereits in den ersten 8 Stunden, *Lewis* (23) 90 Proz.] wurde bei nachfolgenden Versuchen der Harn der ersten 8 Stunden benutzt.

Auffallend sind die qualitativen Veränderungen dieses Harns nach Zuführung von 10 bis 15 g benzoesauren Natriums:

1. Dieser Harn reduziert *Fehling*sche und *Nylander*sche Lösung (erstere Reaktion tritt verzögert auf).

2. Die Naphthoresorcinprobe nach *Tollens* ist positiv, und das Spektrum der ätherischen Farbstofflösung zeigt einen schwarzen Streifen zwischen 500 und 600 μ.

Wenn man anstatt mit Äther mit Chloroform oder Benzol ausschüttelt, bekommt man eine rotviolette bzw. blauviolette Farbe und das Spektrum zeigt wieder denselben typischen Streifen. Nach *C. Neuberg* und *C. Saneyoshi* (42) und *Van der Haar* (51) wird das Vorhandensein der Glucuronsäure durch die beiden letztgenannten Reaktionen typisch angezeigt.

3. Die Orcinprobe ist positiv. Der Harn färbt sich braungrün-grün, während das Spektrum einen Absorptionsstreifen bei 620 μ zeigt, welcher allmählich an Deutlichkeit gewinnt.

4. Die Phloroglucinprobe ist positiv.

Die obengenannten vier Reaktionen weisen auf die Anwesenheit der Glucuronsäure hin; im nachfolgenden werden wir eine fünfte Eigenschaft dieser Substanz besprechen: die Drehung der Polarisationsebene.

Wir betonen, daß die Hippursäure keine von den obengenannten Reaktionen aufweist.

Um die Eigenschaften dieser gepaarten Glucuronsäure sicher zu stellen, soll man die Säure möglichst isolieren. Das beste Lösungsmittel ist das Äthylacetat; wichtig ist weiter, daß die Hippursäure durch Hinzufügung von Mineralsäuren zum größten Teil ausgefällt werden kann [*Kobert* (4)].

Methodik.

Wir fügen dem Harn des Versuchsprobetages (erste 8 Stunden) konzentrierte Salpeter- oder Schwefelsäure (2 Proz. des Volumens) zu (ein Teil der Hippursäure präzipitiert), stellen das Gemisch etwa 24 Stunden in die Kälte und filtrieren.

50 ccm dieses Harnfiltrates schüttelt man mit 6 × 50 ccm Äthylacetat, sammelt diese sechs Portionen in einen Erlenmeyerkolben und destilliert ab. Das Residuum besteht aus einer ölartigen Substanz und Hippursäurekristallen. Diese ölartige Flüssigkeit zeigt die qualitativen Proben der Glucuronsäure in verstärkterem Maße als der native Harn. Wir ersehen hieraus, daß die Glucuronsäurebindung (oder ihre Spaltungsprodukte) auf diese Weise in mehr konzentrierter Form erhalten werden kann.

Bekanntlich dreht die freie Glucuronsäure und ihre Salze rechts, die gepaarten Glucuronsäuren und deren Salze dagegen links, mit Ausnahme der Dimethylaminobenzoesäure von *Jaffé* und der Benzoeglucuronsäure, welche rechts drehen.

Auf Grund unserer Versuche finden wir folgendes:

Der Harn des Vortages dreht nicht oder höchstens einige Hundertstel Grade links; jeder normale Harn kann sich ebenso verhalten.

Der native Harn von den ersten 8 Stunden des Probetages (nach Zuführung von 15 g benzoesauren Natriums) dreht vereinzelt rechts, manchmal verhält er sich inaktiv, meistens aber konstatiert man eine Linksdrehung von 0,06 bis 0,12°; die Linksdrehung in diesem Harn ist aber immer größer als diejenige, welche der Harn des Vortages zeigt. Dies widerspricht den Resultaten *Magnus Levys*, welcher fand, daß der native Harn von Schafen nach Zuführung größerer Dosen benzoesauren Natriums rechts dreht. Falls also beim Menschen wie bei Schafen nach Zuführung einer größeren Dosis von benzoesaurem Natrium eine rechtsdrehende gepaarte Glucuronsäure entsteht, dann müssen im menschlichen Harn linksdrehende Stoffe entweder anwesend sein oder entstehen, welche jene Rechtsdrehung neutralisieren. Aus der Drehung des nativen Harns der ersten 8 Stunden des Probetages kann man keine Schlüsse ziehen; deshalb behandeln wir diesen Harn auf verschiedene Weise, um zu versuchen, ob wir so zu einem Resultat kämen.

A. Nativer Harn.

1. Eine Zufügung von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure[1]) zu 50 ccm nativen Harns des Probetages (erste 8 Stunden) zeigt nach zweistündigem Kochen im Erlenmeyerkolben mit langem Kühler eine Rechtsdrehung von 0,10 bis 0,54 Proz. (auf Glucose berechnet).

2. Eine Zufügung von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure zu 50 ccm nativen Harns des Probetages (erste 8 Stunden), welcher zwei- bis dreimal verdünnt ist, zeigt nach dreistündigem Erwärmen auf dem Wasserbade eine Rechtsdrehung von 0,10 bis 0,54 Proz. (auf Glucose berechnet).

3. Eine Zufügung von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure zu 50 ccm nativen Harns des Probetages (erste 8 Stunden) zeigt nach einstündigem Erwärmen unter Druck auf dem Wasserbade eine Rechtsdrehung von 0,10 bis 0,54 Proz. (auf Glucose berechnet).

[1]) *P. Mayer* und *C. Neuberg* (41) fügen nie mehr als 1 bis 2 Proz. konzentrierte Schwefelsäure zu, da größere Quantitäten die Glucuronsäure zu zersetzen vermögen.

B. Ölartige Substanz (s. Methodik).

Auf dieselbe Weise behandelt, wie unter A. 1., 2. und 3. angegeben, zeigt diese eine nicht unwesentliche Rechtsdrehung.

Diese Rechtsdrehung vom Harn des Probetages nach Behandlung mit Mineralsäuren und Erwärmen (wobei Spaltung eintritt) ist ein wichtiges Argument für die Hypothese, daß der Harn des Probetages (erste 8 Stunden) eine gepaarte Glucuronsäure enthält.

Diese qualitativen Proben wiederholten wir mehr als 40mal und stets mit demselben Resultat.

Weder der Harn des Vortages noch der Harn von den zweiten 8 Stunden des Probetages zeigten die qualitativen Reaktionen der Glucuronsäure.

Bekanntlich fand *Magnus Levy* (6) nach Zuführung größerer Dosen benzoesauren Natriums (15 g und mehr) im Harn von Schafen dieselben qualitativen Veränderungen.

Dakin (13) c. s. und *Lewis* (44) konstatierten dagegen gar keine oder nur geringe qualitative Veränderungen im menschlichen Harn nach Zuführung von benzoesaurem Natrium (5 bis 10 g).

Auf Grund unserer Untersuchungen stellen wir uns hinsichtlich der qualitativen Versuche auf seiten *Magnus Levys*.

Wir stellen fest, daß nach Zuführung größerer Dosen benzoesauren Natriums im menschlichen Harn nebst größeren Quantitäten Hippursäure auch viel Glucuronsäure, an andere Stoffe gepaart, vorkommt. Es erörtert sich die Frage, ob ein Teil der Benzoesäure nicht an Glykokoll gepaart, d. h. als Hippursäure, sondern an Glucuronsäure gepaart, ausgeschieden wird. Falls dem so ist, soll im Harn mehr Benzoesäure vorkommen, als mit dem Benzoesäuregehalt der Hippursäure übereinstimmt. Bevor wir an diese Frage herantreten, müssen wir uns nach einer guten Methodik umsehen:

1. zur Bestimmung des totalen Quantums Benzoesäure im Harn, und zwar die Benzoesäure, welche an Glykokoll, als auch diejenige, welche an Glucuronsäure bzw. an andere Stoffe gebunden ist;

2. zur Bestimmung des Quantums Hippursäure im Harn.

III. Methodik der Benzoesäure- und Hippursäurebestimmung.

A. Benzoesäure.

Methode von Kingsbury-Swanson (21). In einen Kjeldahlkolben pipettiert man 50 ccm Harn, fügt 7 ½ g NaOH und ½ g MgO hinzu und kocht alsdann eine halbe Stunde (das Volumen des Gemisches muß auf 25 ccm zurückgebracht werden). Nun wird 1 ccm 7proz. $KMnO_4$-Lösung hinzugefügt, das Gemisch während 2 Minuten mit kleiner Flamme gekocht, abgekühlt und alsdann der Kolben mit einem gut schließenden Kühler versehen. Durch diesen Kühler läßt man langsam 30 ccm konzentrierte

Salpetersäure in den Kolben fließen, wonach das dunkelbraune Gemisch klar wird. Man kocht nun dieses Gemisch während 45 Minuten unter kleiner Flamme, spült den Kühler mit 25 ccm warmen destillierten Wassers gründlich aus (um einem etwaigen Verlust von im Kühler sublimierter Benzoesäure vorzubeugen) und kühlt den Kolben ab. Der Inhalt des Kolbens wird quantitativ in einen Scheidetrichter übergegossen, welcher 25 g Ammoniumsulfat enthält; nach Lösung des letzteren wird extrahiert mit 50 bzw. 35 und 2 × 25 ccm neutralem, gut gewaschenem Chloroform. Die ersten zwei Portionen Chloroform dienen zur Nachspülung des Kjeldahlkolbens. Die gesamten Extrakte werden in einen zweiten Scheidetrichter gesammelt und mit 100 ccm der *Folin* und *Flander*schen (20) Salzlösung (1 ccm konzentrierter Salzsäure auf 2 Liter gesättigter Salzlösung) gewaschen. Durch ein trockenes Filter wird nun der Chloroform-Extrakt in einen Erlenmeyerkolben übergebracht. Der zweite Scheidetrichter wird mit 20 ccm Chloroform nachgespült. Diese 20 ccm dienen dazu, um das nasse Filter noch einmal auszuziehen, alsdann wird dieses Chloroform durch ein trockenes Filter dem Inhalt des Kolbens hinzugefügt. Man titriert mit n/10 Na-Äthylat (Indikator 1 proz. alkoholisches Phenolphthalein) und berechnet das Quantum Benzoesäure in 50 ccm Harn. (Das gebrauchte Chloroform schnell reinigen, weil sonst die auftretende gelbliche Färbung sich schwieriger entfernen läßt!)

Reinigung des gebrauchten Chloroforms nach Kingsbury und Swanson. Der Harn, dessen Benzoesäuregehalt nach *Kingsbury* und *Swansons* Methode bestimmt werden soll, darf kein Eiweiß enthalten. Die Enteiweißung geschieht folgendermaßen: Dem Harn fügt man 2 proz. Salpetersäure hinzu, weil diese Konzentration der Mineralsäure keine Spaltung der Hippursäure verursacht [*Raiziss* und *Dubin* (48)]. (15 ccm 2 proz. Salpetersäure genügen für etwa 300 ccm Harn.) Zu 50 ccm Harn fügt man drei bis vier Tropfen 0,1 proz. alkoholischer Methylrotlösung und so viel Lauge zu, bis eine hellgelbe Färbung entsteht. Man kocht das Gemisch unter Hinzufügung von so viel n/10 HCl, bis der erste definitive rote Umschlag entsteht. Auf diese Weise wird das Eiweiß quantitativ niedergeschlagen und Fehler bei der Titration sind ausgeschlossen. Das Präzipitat des Eiweißes wird auf einem Filter zweimal mit kochendem Wasser ausgewaschen. Die kombinierten Waschwässer plus Filtrat werden zusammengefügt, ein wenig alkalisch gemacht und über freier Flamme schnell eingedampft, bis zu einem Volumen von 50 ccm; alsdann fügt man dem Gemisch 7½ g NaOH und ½ g MgO zu und verfährt wie oben angegeben.

Wir haben gemeint, das Ausschütteln mit Chloroform folgendermaßen modifizieren zu müssen. Die saure Lösung wird mit 50 bzw. 35 und 2 × 25 ccm Chloroform ausgeschüttelt, diese Portionen in einem zweiten Scheidetrichter gesammelt, 5 Minuten in Ruhe hingestellt und abermals kräftig geschüttelt, damit kleinere Quanten von der sauren wässerigen Lösung, welche an der Scheidetrichterwand adhärieren, von dem Chloroform getrennt werden. Alsdann wird das Chloroformgemisch durch ein neues Filter in einen zweiten Scheidetrichter quantitativ übergegossen, 100 ccm *Folin* und *Flander*scher Lösung hinzugefügt und diesmal 10 Minuten in Ruhe hingestellt. Nun wird das Chloroformgemisch durch ein neues Filter in einen Erlenmeyerkolben von 500 ccm transferiert, das gebrauchte Filter wird in einem Becherglase von 100 ccm mit 50 ccm Chloroform ausgespült, letztere 50 ccm Chloroform durch ein weiteres trockenes Filter zu dem übrigen Chloroform gebracht und das ganze titriert.

B. Hippursäure.

Methode von Snapper-Laqueur (47). Zu 50 ccm pipettiertem Harn[1]) fügt man $12\frac{1}{2}$ g NaCl, damit keine Emulsion beim Ausschütteln mit Äthylacetat auftritt. Nachdem NaCl gelöst ist, wird 0,6 ccm HCl (38proz.) hinzugefügt, um alle Hippurate in Hippursäure umzusetzen. (Der Harn soll mit Kongopapier stark sauer reagieren.)

Dieser Harn wird mit 6 × 50 ccm Äthylacetat[2]) geschüttelt und sämtliche Portionen Äthylacetat mit 25 ccm gesättigter Salzsäure kräftig geschüttelt. Alsdann wird letztere Lösung in einen anderen Scheidetrichter übergeführt und mit dem gleichen Quantum Äthylacetat extrahiert. Diese 75 ccm Äthylacetat werden den ersten 300 ccm Äthylacetatextrakt hinzugefügt, darauf wird die Gesamtmenge bis zur Trockne destilliert. Das Residuum wird mit einem Gemisch von Alkohol und Äthylacetat in einen Meßkolben von 50 ccm gebracht und so lange geschüttelt, bis das Gemisch homogen geworden ist. Man pipettiert hiervon 2 × 20 ccm in je einen Kjeldahlkolben ab und dampft bis zur Trockne ein. Zu den Residua beider Kjeldahlkolben gibt man 10 ccm Bromlauge, schüttelt das Gemisch während 3 Minuten (damit aller Ureumstickstoff entfernt wird), fügt alsdann ein Gemisch von K_2SO_4 und $CuSO_4$, 5 ccm H_2SO_4 (und ein paar Kochsteine) hinzu, verascht das ganze und behandelt die Residua weiter nach der *Kjeldahl*schen Methode. Auf diese Weise wird der Stickstoffgehalt des Äthylacetatextraktes bestimmt, woraus sich die Menge Hippursäure, welche in 50 ccm Harn enthalten ist, berechnen läßt[3]).

Die bei dieser Methode bestehende Gefahr ist die, daß andere stickstoffenthaltende Stoffe, außer der Hippursäure, in das Äthylacetat übergehen können. (Salicylpräparate, Veronal, Gallensäure usw.)

Bekanntlich löst sich das Ureum in Äthylacetat auf, wird aber durch Ausschütteln mit der Salzlösung wieder größtenteils entfernt; eventuelle Reste werden durch Schütteln mit Bromlauge gespalten, nur ein zu vernachlässigender Rest (7 Proz.) entzieht sich dieser Bromlaugespaltung und wird noch in die Berechnung einbezogen. Der Harn darf vor dem Gebrauche nicht durch Eindampfen konzentriert werden, weil dadurch Spaltung der Hippursäure auftritt: eine Tatsache, welche von *Folin* und *Flanders* sowohl wie von *Snapper-Laqueur* betont worden ist. Der Harn wird in einem Gemisch von Chloroform und Toluol (1 : 1) aufgefangen, um Spaltung durch bakterielle Einflüsse zu vermeiden. Selbst wenn wenig Hippursäure im Harn vorkommt, werden nach dieser Methode gute Resultate erzielt, z. B. bei Milch- und Breinahrung.

---

[1]) Der Harn soll nötigenfalls durch Kochen mit Phosphorsäure enteiweißt werden.

[2]) Es empfiehlt sich, das Äthylacetat vor dem Gebrauch mit Aqua dest. zu schütteln, damit die Essigsäure entfernt wird.

[3]) Man beachte nachfolgende Fehlerquellen:

a) Wo es sich um kleine Quantitäten Ammoniak handelt, ist es zu empfehlen, bei der letzten Destillation einen Kupferkolben anstatt eines Glaskolbens zu benutzen.

b) Man überzeuge sich vorher, daß das destillierte Wasser neutral reagiert.

c) Die K_2SO_4 und $CuSO_4$-Präparate sollen ammoniakfrei sein.

Blinde Versuche sind also empfehlenswert, da man ja mit n/50 Lösung titriert. *Snapper* und *Laqueur* fanden, daß die Fehlergrenze zwischen 0,3 und 0,6 ccm n/50 NaOH liegen.

Bevor wir mit den vorgenannten Methoden von *Kingsbury-Swanson* und *Snapper-Laqueur* zu arbeiten anfingen, haben wir uns durch mehrere blinde Versuche davon überzeugt, daß diese Methoden zuverlässige Resultate geben (s. nachfolgende Tabelle).

Zugefügt zu 50 ccm destillierten Wassers	Zurückgefunden in 50 ccm destillierten Wassers nach *Kingsbury-Swanson*	Differenz	
		mg	Proz.
200 mg Hippursäure	137 mg Benzoesäure = 200,9 mg Hippursäure	0,9	0,5
	136,3 mg Benzoesäure = 200 mg Hippursäure	0,0	0,0
	135,6 mg Benzoesäure = 199 mg Hippursäure	1,0	0,5
	135,6 mg Benzoesäure = 199 mg Hippursäure	1,0	0,5

Für die Resultate, welche mit der *Snapper-Laqueur*schen Methode erzielt werden, verweisen wir auf diese Zeitschr. **145**, 32, 1924.

Da wir demnächst die Resultate dieser beiden Methoden miteinander zu vergleichen beabsichtigen, erachten wir es für wünschenswert, vorerst durch blinde Versuche mit normalem Harn, dem ein gegebenes Quantum Hippursäure zugefügt war, festzustellen, ob tatsächlich die Resultate der *Kingsbury-Swanson*schen Methode (total Benzoesäure) mit denjenigen der *Snapper-Laqueur*schen Methode (Hippursäure) zu vergleichen sind.

Tabelle I.

Zugefügt zu 50 ccm normalen Harns	Zurückgefunden in 50 ccm normalen Harns		Differenz nach	
	A. nach *Kingsbury-Swanson*	B. nach *Snapper-Laqueur*	*K.-S.*	*Sn.-L.*
	(+) (++)	(+++) (++++)		
180 mg Hippurs.	142 mg — 23 mg = 119 mg Benzoesäure = 174 mg Hippursäure	208 mg — 34 mg = 174 mg Hippursäure	6 mg	6 mg
250 „ „	204,5 mg — 34 mg = 170,5 mg Benzoesäure = 250,6 mg Hippurs.	288 mg — 35 mg = 253 mg Hippursäure	0,6 „	3 „
70 „ „	100 mg — 53 mg = 47 mg Benzoesäure = 69 mg Hippursäure	163 mg — 91,7 mg = 71,3 mg Hippursäure	1 „	1,3 „
90 „ „	76 mg — 15,5 mg = 60,5 mg Benzoesäure = 88,5 mg Hippurs.	115 mg — 30 mg = 85 mg Hippursäure	1,5 „	5 „

(+) Werte für Benzoesäure nach Zuführung von Hippursäure.
(++) Werte für Benzoesäure vor Zuführung von Hippursäure.
(+++) Werte für Hippursäure nach Zuführung von Hippursäure.
(++++) Werte für Hippursäure vor Zuführung von Hippursäure.

Aus dieser Vergleichungstabelle geht also hervor, daß mit beiden Methoden, praktisch gesprochen, die hinzugefügte Hippursäure quantitativ zurückgefunden wird. Hieraus darf man schließen, daß, falls alle im Harn vorkommende Benzoesäure als Hippursäure auftritt, die Resultate der *Kingsbury-Swanson*schen Methode denjenigen der *Snapper-Laqueur*schen Methode genau entsprechen müssen. Sollte aber die zugeführte Benzoesäure nicht als Hippursäure, sondern an andere Stoffe gepaart ausgeschieden werden, dann muß die *Kingsbury-Swanson*sche Methode höhere Werte aufweisen als die *Snapper-Laqueur*sche Methode. Umgekehrt aber folgt aus dem Vorhergegangenen,

daß, falls im Harn die *Kingsbury-Swanson*sche Methode höhere Werte aufweist als die *Snapper-Laqueur*sche Methode, tatsächlich Benzoesäure an andere als an Glykokoll gepaarte Stoffe ausgeschieden wird.

IV. Experimenteller Teil.

A. Versuche nach den Kingsbury-Swansonschen und Snapper-Laqueurschen Methoden im normalen Harn und nach Zuführung von benzoesaurem Natrium (10 bis 15 g).

Die nachfolgenden Versuche dienten dazu, um zu bestimmen:

1. das Totalquantum Benzoesäure, d. h. die Benzoesäure, welche an Glykokoll gepaart ist plus diejenige Menge, welche an andere Stoffe, besonders an Glucuronsäure gebunden ist;

2. das Quantum Hippursäure und daraus das Quantum Benzoesäure, welches an Glykokoll gepaart ist;

3. die qualitativen Eigenschaften des Harns (s. S. 252).

Alle Versuche fanden statt *vor* (*Vortag*) und *nach* dem Gebrauch von größeren Dosen benzoesauren Natriums (*Probetag*), und zwar gleichzeitig und derart, daß bei beiden Methoden mit demselben Volumen gearbeitet wurde.

Protokolle.

Der Kürze wegen wird *nur der erste Versuch* ausführlich angeführt.

Versuch 1. Vortag. 15. November 1922.

Der Harn des Patienten wird während 12 Stunden aufgefangen. Quantum 1335 ccm. Spez. Gew. 1014. Reaktion: sauer. Eiweiß: negativ.

	Fehling	negativ
	Nylander	,,
Glucuronsäure-reaktionen:	Naphthoresorcin	,,
	Orcin	,,
	Phloroglucin	,,

Quantitative Versuche fanden nicht statt.

Versuch 1. Probetag. 16. November 1922.

15 g benzoesaures Natrium zugeführt. Patient hat keine Beschwerde.
Der Harn wird gleich nach der Zuführung während der ersten 8 Stunden aufgefangen.
Quantum 710 ccm. Spez. Gew. 1014. Reaktion sauer. Eiweiß negativ.

	Fehling[1])	Eine verzögert auftretende, allmählich stärker werdende positive Reaktion.	
	Nylander	positiv	
Glucuron-säure-reaktionen:	Naphthoresorcin . . .	positiv;	schwarzes Band 550 bis 600.
	Orcin[2])	,,	Streifen bei 620.
	Phloroglucin	,,	Streifen zwischen D und E.

[1]) Die *Fehling*sche Lösung soll 1 : 1 im Verhältnis zum Harn genommen werden.

[2]) Das Orcinspektrum wird am besten im Halbdunkel wahrgenommen. Der Streifen zeigt sich zuerst schwach und wird allmählich deutlicher.

Quantitative Versuche:

Bestimmung des Totalquantums Benzoesäure (*Kingsbury-Swanson*).

Für 25 ccm Harn gebraucht man 36,65 ccm Na-Äthylat 0,089 N.

Für 25 ccm Harn (Kontrollversuch) 36,45 ccm Na-Äthylat 0,089 N.

In 710 ccm Harn befinden sich durchschnittlich 11,312 g Benzoesäure.

Bestimmung der Hippursäure (*Snapper-Laqueur*).

In 710 ccm Harn befinden sich: A. 15,629 g Hippursäure, B. 15,157 g Hippursäure, durchschnittlich also 15,393 g Hippursäure übereinstimmend mit 10,491 g Benzoesäure.

Bei der Bestimmung des Totalquantums Benzoesäure werden also 821 mg mehr gefunden als übereinstimmt mit dem Benzoesäuregehalt der Hippursäure.

Die quantitativen Versuche des Vortages fanden, wie gesagt, nicht statt, was übrigens — wie sich aus dem Vorhergehenden ergibt — das gegenseitige Verhältnis der Werte nicht ändert.

Von den zugeführten 15 g benzoesauren Natriums fanden wir also im Harne der ersten 8 Stunden 11,312 g Benzoesäure zurück: 89 Proz.

Versuch 2. Vortag. 23. November 1922.

Quantum nicht bestimmt. Spez. Gew. 1018. Reaktion sauer. Eiweiß negativ.

Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Versuch 2. Probetag. 24. November 1922.

15 g benzoesaures Natrium zugeführt.

Patient hat schon nach einer halben Stunde vomiert.

Der Harn ist während der ersten 8 Stunden aufgefangen.

Quantum 600 ccm. Spez. Gew. 1020. Reaktion sauer. Eiweiß negativ.

Qualitative Reaktionen sämtlich positiv.

Quantitative Versuche:

In 600 ccm Harn fanden wir nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich[1]) 5,762 g Benzoesäure, und nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 7,8 g Hippursäure gleich 5,316 g Benzoesäure.

Bei der Bestimmung des totalen Benzoesäuregehaltes des Harns werden also 446 mg Benzoesäure mehr vorgefunden als übereinstimmt mit dem Benzoesäuregehalt der im Harn vorkommenden Hippursäure, d. h., daß 7,7 Proz. der ausgeschiedenen Benzoesäure nicht an Glykokoll gebunden sind.

Des weiteren ersieht man, daß bereits eine halbe Stunde nach Zuführung des Medikamentes ungefähr die Hälfte der Dosis resorbiert worden ist und daß man, trotz des Erbrechens, ein Plus an Benzoesäure konstatiert.

Versuch 3. Vortag. 25. November 1922.

Der Harn wird während 12 Stunden aufgefangen.

Quantum 1025 ccm. Spez. Gew. 1017. Reaktion sauer. Eiweiß negativ.

Qualitative Reaktionen negativ, ausgenommen Naphthoresorcin, schwach positiv, graues Band 580 bis 600.

---

[1]) In diesen Protokollen wird mit „durchschnittlich" immer angegeben, daß Doppelanalysen stattfanden.

Quantitative Versuche:

In 1025 ccm Harn fanden wir nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 519 mg Benzoesäure und nach *Snapper-Laqueur* 756 mg Hippursäure gleich 515 mg Benzoesäure.

Versuch 3. Probetag. 26. November 1922.

15 g benzoesaures Natrium zugeführt. Keine Beschwerde, gemischte Diät.

Der Harn ist während dreimal 8 Stunden aufgefangen.

Harn der ersten 8 Stunden:

Quantum 880 ccm. Spez. Gew. 1018. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich positiv.

Quantitative Versuche:

In 880 ccm Harn fanden wir nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 11,646 g Benzoesäure und nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 15,624 g Hippursäure gleich 10,648 g Benzoesäure.

Plus von nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure 998 mg: 8 ½ Proz.

Harn der zweiten 8 Stunden:

Quantum 225 ccm. Spez. Gew. 1018. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

In 225 ccm Harn fanden wir nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 369 mg Benzoesäure und nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 419 mg Hippursäure gleich 286 mg Benzoesäure, also ein Plus von 83 mg Benzoesäure.

Harn der dritten 8 Stunden:

Quantum 600 ccm. Spez. Gew. 1018. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

In 600 ccm Harn fanden wir nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 483 mg Benzoesäure und nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 616 mg Hippursäure gleich 422 mg Benzoesäure, also ein Plus von 61 mg Benzoesäure.

Von den zugeführten 15 g benzoesauren Natriums fanden wir also zurück 12,498 g minus 0,515 g (des Vortages) gleich 11,983 g Benzoesäure: 94 ½ Proz.

Obgleich wir bereits früher festgestellt hatten, daß nur zu vernachlässigende Mengen ungebundener Benzoesäure im Harn vorkommen, haben wir sicherheitshalber bei den nachfolgenden Versuchen den Harn nach der Methode von *Wiechowski* (S. 251) auf freie Benzoesäure untersucht, um zu konstatieren, daß keine Hippursäure bzw. andere Benzoesäurepaarlinge gespalten werden.

Versuch 4. Vortag. 21. Januar 1923.

Der Harn wird während 24 Stunden in 5 ccm konzentrierter Salpetersäure aufgefangen.

Quantum 1960 ccm. Spez. Gew. 1018. Eiweiß negativ.

Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure[1]), nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 1,452 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchnittlich 2,575 g Hippursäure gleich 1,754 g Benzoesäure.

Versuch 4. Probetag. 22. Januar 1923.

Zugeführt 6 × 2½ g benzoesaures Natrium in Oblaten innerhalb ½ Stunde. Keine Beschwerde. Gemischte Diät.

Der Harn ist während 24 Stunden in drei Perioden (9, 7 und 8 Stunden) aufgefangen.

Harn der ersten 9 Stunden:

Quantum 1150 ccm. Spez. Gew. 1017. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich positiv.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 11,037 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 14,360 g Hippursäure gleich 9,787 g Benzoesäure.

Plus von nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure 1250 mg: 11,3 Proz.

Harn der zweiten 7 Stunden:

Quantum 362½ ccm. Spez. Gew. 1022. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich negativ, ausgenommen Fehling: schwach positiv.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 1,611 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 2,356 g Hippursäure gleich 1,606 g Benzoesäure, also ein Plus von 5 mg Benzoesäure.

Harn der dritten 8 Stunden:

Quantum 312½ ccm. Spez. Gew. 1018. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 325 mg Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 478 mg Hippursäure gleich 326 mg Benzoesäure, also ein Minus von 1 mg Benzoesäure.

Von den zugeführten 15 g benzoesauren Natriums fanden wir also zurück 12,974 g minus 1,826 g (des Vortages) gleich 11,148 g Benzoesäure, etwa 90 Proz.

Versuch 5. Vortag. 29. Januar 1923.

Der Harn wird während 24 Stunden in 5 ccm konzentrierter Salpetersäure aufgefangen.

Quantum 2060 ccm. Spez. Gew. 1014. Eiweiß negativ.

Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 1,136 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 1,719 g Hippursäure gleich 1,171 g Benzoesäure.

---

[1]) Sämtliche Wiechowski-Bestimmungen wurden doppelt ausgeführt.

Versuch 5. Probetag. 30. Januar 1923.

Zugeführt 6 × 2½ g benzoesaures Natrium in Oblaten innerhalb ½ Stunde.

Keine Beschwerde. Gemischte Diät.

Der Harn ist während dreimal 8 Stunden aufgefangen.

Harn der ersten 8 Stunden.

Quantum 1230 ccm. Spez. Gew. 1016. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich positiv.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 10,750 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 14,600 g Hippursäure gleich 9,951 g Benzoesäure, also ein Plus von nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure 799 mg: 7,9 Proz.

Harn der zweiten 8 Stunden:

Quantum 375 ccm. Spez. Gew. 1024. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 477 mg Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 693 mg Hippursäure gleich 472 mg Benzoesäure.

Harn der dritten 8 Stunden:

Quantum 730 ccm. Spez. Gew. 1011. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 387 mg Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 529 mg Hippursäure gleich 360 mg Benzoesäure.

Von den zugeführten 15 g benzoesauren Natriums fanden wir also zurück 11,614 g minus 1,136 g (des Vortages) gleich 10,478 g Benzoesäure: 83 Proz.

Versuch 6. Vortag. 6. Februar 1923.

Der Harn wird während 24 Stunden in 5 ccm konzentrierter Salpetersäure aufgefangen.

Quantum 1600 ccm. Spez. Gew. 1027. Eiweiß negativ.

Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 1,450 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 2,374 g Hippursäure gleich 1,618 g Benzoesäure.

Versuch 6. Probetag. 7. Februar 1923.

Zugeführt 6 × 2½ g benzoesaures Natrium in Oblaten innerhalb ½ Stunde.

Keine Beschwerde. Gemischte Diät.

Der Harn ist während dreimal 8 Stunden aufgefangen.

Harn der ersten 8 Stunden:

Quantum 700 ccm. Spez. Gew. 1022. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich positiv.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 6,166 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 8,329 g Hippursäure gleich 5,677 g Benzoesäure, also ein Plus von nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure 489 mg: 7,93 Proz.

Man beachte, daß während dieser ersten 8 Stunden nur etwa die Hälfte des zugeführten Natrium Benzoicum ausgeschieden ist; demnach dürfte man das fehlende Quantum während der zweiten Periode erwarten; dies erweist sich als richtig.

Harn der zweiten 8 Stunden:

Quantum 540 ccm. Spez. Gew. 1026. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich positiv.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 5,764 g Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 7,800 g Hippursäure gleich 5,317 g Benzoesäure, also ein Plus von nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure 447 mg: 7,75 Proz.

Wir konstatieren, daß die Ausscheidung der Hippursäure sowie der anderen Benzoesäurebindung(en) bei diesem Patienten sehr langsam stattfindet, indem wir des weiteren sehen, daß die Ausscheidung dieser Stoffe *parallel* verläuft.

Harn der dritten 8 Stunden:

Quantum 370 ccm. Spez. Gew. 1027. Reaktion sauer. Eiweiß negativ. Qualitative Reaktionen sämtlich negativ.

Quantitative Versuche:

Nach *Wiechowski* nur zu vernachlässigende Spuren freier Benzoesäure, nach *Kingsbury-Swanson* durchschnittlich 533 mg Benzoesäure, nach *Snapper-Laqueur* durchschnittlich 791 mg Hippursäure gleich 537 mg Benzoesäure.

Von den zugeführten 15 g benzoesauren Natriums fanden wir also zurück 12,463 g minus 1,541 g (Vortag) gleich 10,922 g Benzoesäure = 86 Proz.

Vergleichen wir den Wert des Totalquantums Benzoesäure mit dem der aus Hippursäure berechneten Benzoesäure, so ergibt sich folgendes:

Im Harn des Probetages (erste 8 Stunden) finden wir stets ein Plus von Benzoesäure, welche nicht an Glykokoll, sondern an andere Stoffe gepaart ist.

Die quantitativen Versuche mit dem nativen Harn der ersten 8 Stunden des Probetages verlaufen parallel mit den qualitativen Reaktionen, d. h. immer, wenn ein Plus von Benzoesäure vorkommt, sind die Reaktionen von Fehling, Nylander, Naphthoresorcin, Orcin und Phloroglucin positiv: aller Wahrscheinlichkeit nach ist also ein Teil der ausgeschiedenen Benzoesäure an Glucuronsäure gepaart (7 bis $11\frac{1}{2}$ Proz.).

B. Versuche nach der modifizierten Methode Kingsbury-Swanson.

Nach dem Vorhergehenden könnte man eventuell noch folgenden Einspruch erheben. Die Benzoesäure wird nach *Kingsbury-Swanson im Harne selbst* bestimmt, dagegen wird die Hippursäure nach *Snapper-Laqueur* im *Äthylacetatextrakt* des Harns berechnet. Man könnte fragen, ob solche

großen Quantitäten Hippursäure, wie unsere Versuche ergaben, auch völlig in das Äthylacetat übergehen, weil es immerhin möglich sein könnte, daß beim Ausschütteln ein Teil der Hippursäure im Harne zurückbleibt, wodurch man bei der Berechnung der im Äthylacetat vorhandenen Hippursäure zu kleine Werte für das Quantum an Glykokoll gepaarter Benzoesäure erhalten würde und infolgedessen beim Vergleichen der für das Totalquantum Benzoesäure gefundenen Werte sich ein Plus finden würde.

Wäre dies der Fall, dann wäre das obenerwähnte Plus teilweise auf einen Fehler in unserer Methode zurückzuführen.

Dieser Einwand ist jedoch nicht zutreffend. Auf S. 257 Tabelle I haben wir den Beweis geliefert, daß die dem Harne zugefügte Hippursäure sowohl nach *Kingsbury-Swanson*, wie nach *Snapper-Laqueur* quantitativ zurückgefunden wird. Beim Ausschütteln mit Äthylacetat nach *Snapper-Laqueur* bleibt also keine Hippursäure im Harne zurück.

Nichtsdestoweniger haben wir die im vorigen Abschnitt erwähnten Versuche nach *Kingsbury-Swanson* im Äthylacetat[1]) bestimmt.

Unsere Methode, die wir künftighin die modifizierte Methode von *Kingsbury-Swanson* benennen, ist folgende:

2 × 100 ccm Harn werden mit HCl angesäuert, jede Portion mit 6 × 100 ccm Äthylacetat ausgeschüttelt und halbiert.

Der ersten Hälfte Äthylacetat wird ein bestimmtes Quantum Lauge ($7\frac{1}{2}$ ccm NaOH, $33^1/_3$proz.) hinzugefügt, damit eine starke alkalische Reaktion auftritt (um Verlusten an Benzoesäure bzw. Benzoeglucuronsäure vorzubeugen), und dann wird abdestilliert. Das Residuum wird in 50 ccm destillierten Wassers gelöst, 500 mg MgO und 5 g NaOH hinzugefügt[2]) und weiter unter Berücksichtigung der nachfolgenden Abänderungen nach *Kingsbury-Swanson* verfahren.

Nachdem nämlich die Flüssigkeit mit HNO_3 gekocht worden ist und abgekühlt ist, kann man dieselbe nicht sofort mit Chloroform ausschütteln und titrieren.

Beim Abdestillieren des Äthylacetats ist ja Essigsäure frei geworden, welche weder durch Kochen mit Lauge noch durch Kochen mit Salpetersäure zerstört wird. Falls man also mit Chloroform ausschüttelt, würden sowohl Benzoesäure als Essigsäure übergehen; bei Titrierung erhielte man also zu hohe Werte. Folglich soll die Essigsäure entfernt werden. Zu diesem Zwecke haben wir die Flüssigkeit nach dem Kochen mit Petroläther ausgeschüttelt, welcher wohl die Benzoesäure, jedoch nicht die Essigsäure aufnimmt.

Nach dem Kochen mit HNO_3 wird die Flüssigkeit mit 10 × 50 ccm Petroläther geschüttelt, dieser nachher filtriert und das Filter mit frischem Petroläther nachgespült. Schließlich wird das Filtrat mit 4 × 25 ccm 10proz. NaOH geschüttelt, wodurch alle Benzoesäure in die wässerige Lösung übergeht. Diese 100 ccm alkalische Lösung werden so lange gekocht, bis eventuell mit hinübergegangener Petroläther verdunstet ist. Nach Abkühlung wird die Lösung mit konzentrierter Salpetersäure stark angesäuert, mit Chloroform nach der Methode von *Folin* und *Flanders* ausgeschüttelt und schließlich mit Na-Äthylat titriert.

---

[1]) Bekanntlich sind sowohl Hippursäure und Benzoesäure sowie auch Benzoeglucuronsäure in Äthylacetat leicht löslich.

[2]) $7\frac{1}{2}$ ccm $33^1/_3$proz. NaOH wurden schon bei der Destillation verbraucht.

Die restierenden 300 ccm Äthylacetat werden gänzlich nach der *Snapper-Laqueur*schen Methode behandelt.

Die anderen 600 ccm Äthylacetat dienen zu Kontrollversuchen.

Nach verschiedenen blinden Versuchen mit wässerigen Lösungen und mit Harn, mit oder ohne Zufügung eines bestimmten Quantums Hippursäure, haben wir festgestellt, daß mit der modifizierten Methode von Kingsbury-Swanson befriedigende Resultate erzielt werden können, wenn man mit einem konstanten Fehler von 0,4 ccm Na-Äthylat 0,09 n rechnet, welcher von den Titrationswerten zu subtrahieren ist.

In nachfolgender Tabelle findet man die Resultate der Versuche, in denen wir den Harn vor und nach Zuführung von 15 g benzoesauren Natriums untersuchten auf: 1. Totalquantum Benzoesäure nach der modifizierten Methode *Kingsbury-Swanson*; 2. Hippursäure nach der Methode *Snapper-Laqueur*.

Tabelle II.

Totalquantum Benzoesäure nach der modifizierten Methode von *Kingsbury-Swanson*, Hippursäure nach *Snapper-Laqueur*.

Datum	Zugeführt g	Probe		Totalquantum Benzoesäure g	Benzoesäure als Hippursäure g	Nicht an Glykokoll gepaarte Benzoes. g	Prozentual	Glucuronsäurereaktionen
24. VII. 1922	10	1	Vortag 24 Std.	0,948	0,942	—		— — —
			Probetag 24 Std.	7,430	6,880	0,550	7,4 Proz.	+ + +
14. IX. 1922	10	2	Vortag 24 Std.	0,345	0,342	—		— — —
			Probetag					
			erste 3 Std.	3,856	3,429	0,428	12,2 Proz.	+ + +
			zweite 3 Std.	3,5155	3,2195	0,296		+ + +
			dritte 3 Std.	0,423	0,305	0,118		— — —
			vierte 3 Std.	0,444	0,283	0,161		— — —
25. IX. 1922	10	3	Vortag	0,734	0,714	—		— — —
			Probetag					
			erste 12 Std.	7,933	7,375	0,558	7 Proz.	+ + +
			zweite 12 Std.	0,265	0,248	—		— — —

Zusammenfassend ergibt sich, daß bei Versuchen nach dem ursprünglichen Verfahren von *Kingsbury-Swanson* bzw. *Snapper-Laqueur* immer ein Plus an Benzoesäure gefunden wird, welche nicht an Glykokoll gepaart ist.

Die modifizierte Methode *Kingsbury-Swanson* weist die nämlichen Resultate auf: auch hier finden wir immer dasselbe Plus von nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure zurück, mit anderen Worten: *Die Hippursäure, welche nach Zuführung von 10 bis 15 g benzoesauren Natriums im Harne vorkommt, geht völlig in Äthylacetat über, wenn man den Harn des Probetages genügend mit demselben geschüttelt hat* (siehe Methodik).

V. Mineralsäuren fällen die Benzoeglucuronsäure im Harne nicht.

Da die verabreichte Benzoesäure zu 80 bis 95 Proz. als Hippursäure im Harn vorkommt, kann der Unterschied zwischen dem Totalquantum Benzoesäure und der an Hippursäure gebundenen Benzoesäure nur einzelne Prozente betragen.

Es ist klar, daß man deutlichere und übersichtlichere Resultate erzielt, wenn dieser Unterschied größer wird. Zu diesem Zwecke versuche man, die Hippursäure aus dem Harne zu entfernen, ohne jedoch die an andere Stoffe gebundene Benzoesäure zu beeinflussen.

Bekanntlich wird die Hippursäure von HNO_3 und H_2SO_4 niedergeschlagen [*Kobert* (4)]. Nach Zufügung dieser Säuren (2 Proz. des Volumens) zum Harn des Probetages und nachdem dieser einige Zeit kühl aufbewahrt ist, entsteht allmählich ein flockiger Niederschlag.

Nun ist die Frage, ob im Niederschlag nur Hippursäure vorkommt, oder ob auch andere, nicht an Glykokoll gepaarte Benzoesäurebindungen präzipitiert werden. Der nachfolgende Versuch gibt uns hierüber Auskunft.

Versuch. 6. September 1922.

Einem Patienten werden 10 g benzoesaures Natrium verabreicht. Der Harn der zweiten 3 Stunden wird aufgefangen. Einem Teil desselben (310 ccm) werden 6,2 ccm konzentrierter Salpetersäure zugefügt. Das Gemisch wird an kühler Stelle während 2 × 24 Stunden aufbewahrt. Es entsteht ein Präzipitat, welches, nach Abfiltrieren des Harns, im Exsikkator bis zu konstantem Gewicht stehen bleibt. Ein bestimmtes Quantum dieses Niederschlags wird nach *Kingsbury-Swanson* und *Snapper-Laqueur* behandelt.

200 mg weisen nach *Kingsbury-Swanson* 132 mg Benzoesäure gleich 199½ mg Hippursäure auf (Doppelanalyse); nach *Snapper-Laqueur* findet man von 200 mg 197½ mg Hippursäure zurück (Doppelanalyse). Hieraus ergibt sich, daß mit Salpetersäure nur Hippursäure, nicht aber die unbekannte Benzoesäurepaarung niedergeschlagen ist, und zu gleicher Zeit, daß man hierdurch über eine Methode verfügt, um diese von jener zu trennen.

Um festzustellen, daß während dieser 2 × 24 Stunden keine Spaltung der Hippursäure stattgefunden hat, haben wir das Filtrat auf freie Benzoesäure untersucht: 25 ccm des Harnfiltrats werden mit 6 × 50 ccm Petroläther ausgeschüttelt, dieser verdunstet usw. (Methode von *Wiechowski*). Es entstehen keine Kristalle und zur Titration genügen ein paar Tropfen Lauge (0,2 n).

Wir kommen nun zu dem nachfolgenden Resultat: *Wenn dem Harn 2proz. konzentrierte Salpetersäure zugefügt worden ist und man dieses Gemisch während 2 × 24 Stunden an kühler Stelle aufbewahrt, tritt keine Spaltung von gebundener Benzoesäure auf, während man im Filtrat bedeutend weniger Hippursäure, jedoch ein gleiches Quantum von nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure findet.*

Gemäß obengenanntem Verfahren haben wir nun den Harn sämtlicher Probetage der in Kapitel IV, A., erörterten Versuche aufs neue nach *Kingsbury-Swanson* und *Snapper-Laqueur* behandelt; das Resultat findet man in nachfolgenden Protokollen.

Versuch 1. 28. November 1922.

(Siehe auch Versuch 3, Probetag, ersten 8 Stunden, S. 260.)

Nach Beendigung der qualitativen und quantitativen Versuche des nativen Harns (880 ccm) fügt man dem Überschuß (530 ccm) 12 ccm konzentrierter Schwefelsäure zu. Der im Harne entstandene Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat nach den beiden oben erwähnten Methoden untersucht[1]).

Quantitative Bestimmung: 880 ccm Harnfiltrat enthält durchschnittlich ein Totalquantum von 2,605 g Benzoesäure und 2,439 g Hippursäure gleich 1,662 g Benzoesäure.

Bei der Bestimmung des Totalquantums Benzoesäure werden also 943 mg Benzoesäure mehr gefunden als übereinstimmt mit dem Benzoesäuregehalt der Hippursäure. Im nativen Harn des Probetages war dieses Plus 998 mg.

Aus diesem einfachen Versuche ergibt sich, daß nach Entfernung der Hippursäure in größtmöglichem Quantum das Harnfiltrat noch ungefähr dasselbe Plus wie der native Harn aufweist, nämlich 943 mg Benzoesäure. Die Differenz (55 mg) mit dem Plus des Probetages ist darauf zurückzuführen, daß zwar der Niederschlag abgesaugt, aber nicht nachgewaschen wurde, wodurch ein kleines Quantum der unbekannten Benzoesäurepaarung auf dem Filter zurückgeblieben ist.

Versuch 2. 24. Januar 1923.

(Siehe auch Versuch 4, Probetag, erste 9 Stunden, S. 261.)

Dem Überschuß des nativen Harns (375 ccm) werden 7½ ccm HNO_3 zugefügt, weitere Behandlung wie oben. Quantum des nativen Harns 1150 ccm.

Das Harnfiltrat wird untersucht auf: a) Freie Benzoesäure (Doppelanalyse), b) Totalquantum Benzoesäure (Doppelanalyse), c) Hippursäure (Doppelanalyse).

Quantitative Bestimmung: Freie Benzoesäure ist im Harnfiltrat nicht aufzuweisen. 1150 ccm Harnfiltrat enthalten durchschnittlich 3,112 g Benzoesäure und 3,130 g Hippursäure gleich 2,133 g Benzoesäure.

Bei der Bestimmung des Totalquantums Benzoesäure werden also 1,179 g Benzoesäure mehr gefunden als übereinstimmt mit dem Benzoesäuregehalt der Hippursäure. Im nativen Harn des Probetages war dieses Plus 1,250 g. Die Differenz von 71 mg kommt auf Rechnung der Filtration, siehe oben.

Versuch 3. 31. Januar 1923.

(Siehe auch Versuch 5, Probetag, erste 8 Stunden, S. 262.)

Dem Überschuß des nativen Harns (305 ccm) werden 6,2 ccm HNO_3 zugefügt, weitere Behandlung wie oben. Quantum des nativen Harns 1230 ccm.

---

[1]) Die gefundenen Werte multipliziere man mit 542/539. Für andere Versuche mutatis mutandis.

Quantitative Bestimmung: Freie Benzoesäure ist im Harnfiltrat fast nicht aufzuweisen. 1230 ccm Harnfiltrat enthalten durchschnittlich 2,903 g Benzoesäure und 3,198 g Hippursäure gleich 2,180 g Benzoesäure. Plus 723 mg Benzoesäure; Plus im nativen Harn 799 mg Benzoesäure. Die Differenz von 76 mg kommt auf Rechnung der Filtration, siehe oben.

Versuch 4. 9. Februar 1923.

(Siehe auch Versuch 6, Probetag, erste 8 Stunden, S. 262.)

Dem Überschuß des nativen Harns (300 ccm) werden 3 Proz. des Volumens konzentrierter Salpetersäure zugefügt, weitere Behandlung wie oben. Quantum des nativen Harns 700 ccm.

Quantitative Bestimmung: Freie Benzoesäure ist im Harnfiltrat fast nicht aufzuweisen. 700 ccm Harnfiltrat enthalten durchschnittlich 2,307 g Benzoesäure und 2,602 g Hippursäure gleich 1,774 g Benzoesäure.

Plus 533 mg Benzoesäure; Plus im nativen Harn 490 mg Benzoesäure. Diesmal haben wir also keinen Verlust, sondern einen Überschuß von 43 mg[1]).

Zusammenfassend konstatieren wir, daß die Resultate nach der *Kingsbury-Swanson*schen Methode im Vergleich zu derjenigen von *Snapper-Laqueur* folgendes ergeben:

1. Das Harnfiltrat (nach Mineralsäurezusatz) weist dasselbe Quantum nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure auf wie der native Harn.

2. Die qualitativen Reaktionen des Harnfiltrats bleiben unverändert.

3. Aus den beiden vorhergehenden Befunden folgt, daß das Plus an Benzoesäure wenigstens teilweise an Glucuronsäure gepaart ist.

VI. Identifizierung des Totalquantums Benzoesäure.

Das Totalquantum Benzoesäure haben wir nach der Methode *Kingsbury-Swanson* bestimmt. Diese Autoren sind der Meinung, daß die an Glykokoll und andere Stoffe gepaarte Benzoesäure in Chloroform löslich ist und durch Titration mit Na-Äthylat bestimmt werden kann. Mit Recht könnte man fragen, ob außer der Benzoesäure etwa andere sauer reagierende Stoffe in das Chloroform aufgenommen worden sind, mit anderen Worten: kann man sich auf die für Benzoesäure erhaltenen titrimetrischen Werte durchaus verlassen? Um diesen Zweifel zu beseitigen, haben wir folgende Versuche vorgenommen:

Versuch 1.

2 × 25 ccm Harn der ersten 8 Stunden eines Probetages werden nach *Kingsbury-Swanson* behandelt und mit Chloroform ausgeschüttelt.

Die Chloroformlösung der ersten 25 ccm wird titriert.

Resultat 135 mg Benzoesäure.

Die Chloroformlösung der zweiten 25 ccm wird nicht titriert, sondern an der Luft bis zur Trockne verdunstet.

---

[1]) Die qualitativen Reaktionen des Harnfiltrats dieser vier Versuche waren sämtlich positiv.

Das Residuum wird quantitativ in ein Tarierglas übergebracht und sublimiert; das Sublimat wird gewogen.

Resultat 128 mg Benzoesäure.

Verlust 7 mg, welcher auf Rechnung des Sublimationsfehlers zu setzen ist.

Die Bestimmung der Hippursäure nach *Snapper-Laqueur* ergibt für 25 ccm 140 mg gleich 95½ mg Benzoesäure (Doppelanalyse).

Die Sublimation weist also ein Plus von 32½ mg (128 mg minus 95½ mg) nicht an Glykokoll gepaarter Benzoesäure auf.

Als Schmelzpunkt dieser 128 mg Benzoesäure fanden wir nach erster Sublimation 119 bis 120°, nach zweiter Sublimation 121 bis 121,5° (Schmelzpunkt von Benzoesäure nach *Kempf* 121,4°).

Die Sublimation geschieht folgendermaßen:

Das nach Verdunstung des Chloroforms zurückbleibende Residuum wird in ein Tarierglas übergebracht, in ein Sandbad gestellt und bei einer Temperatur von 120° sublimiert.

Um den Temperaturunterschied zu vergrößern, wird das Tarierglas mit in Äther getränkter Watte abgedeckt.

Nach Beendigung der Sublimation wird der zuvor tarierte Deckel des Tarierglases aufs neue gewogen. Die Gewichtsdifferenz ist auf Rechnung der sublimierten Substanz zu stellen.

Zum Schlusse wird der Schmelzpunkt des Sublimats bestimmt.

Im Tarierglas bleibt ein kleines bräunliches Residuum zurück, welches bei Titration, praktisch genommen, keine Säure aufweist.

Bei dem nachfolgenden Versuche haben wir statt des nativen Harns des Probetages das Filtrat nach Säurezusatz verwendet, weil die Differenz zwischen dem Totalquantum Benzoesäure und der Benzoesäure der Hippursäure im letzteren prozentual größer ist.

Versuch 2.

2 × 25 ccm Filtrat werden wie oben behandelt.

Die Titration ergibt für die ersten 25 ccm 54½ mg Benzoesäure.

Nach Sublimation und Tarierung finden wir in den zweiten 25 ccm 54 mg Benzoesäure.

Die Bestimmung der Hippursäure nach *Snapper-Laqueur* ergibt 58,7 mg Hippursäure gleich 40 mg Benzoesäure (Doppelanalyse).

Auch hier bleibt nach Sublimation ein Plus: 14 mg.

Schmelzpunkt des sublimierten Stoffes 119°; nach zweiter Sublimation 121 bis 121,5°, welches genau mit den *Kempf*schen Angaben übereinstimmt.

Diesen Versuch wiederholten wir noch dreimal mit den Harnfiltraten von anderen Probetagen, und zwar mit demselben Resultat.

Mithin steht fest, daß die titrimetrischen Werte, welche nach der Methode von Kingsbury-Swanson erhalten werden, tatsächlich das Totalquantum im Harn vorkommender Benzoesäure wiedergeben.

Sowohl bei Titration als bei Sublimation ergibt sich, daß das Quantum an Glykokoll gepaarter Benzoesäure, welches im Harn des Probetages vorkommt, kleiner ist als das im Harn vorkommende

Tabelle III.

Ausscheidung von Hippursäure und anderen Benzoesäure-Paarlingen *im nativen Harn.* Totalquantum Benzoesäure nach *Kingsbury-Swanson.* Hippursäure nach *Snapper-Laqueur.* Freie Benzoesäure nach *Wiechowski.*

Datum	Zugeführt g	Probe		Totalquantum Benzoesäure g	Benzoesäure als Hippursäure g	Nicht an Glykokoll gepaarte Benzoesäure g	Nicht an Glykokoll gepaarte Benzoesäure Proz.	Freie Benzoesäure mg	Glucuronsäurereaktionen
16. XI. 22	15	1	Probetag: erste 8 Std.	11,312	10,491	0,821	7,3	nicht bestimmt	+ + +
24. XI. 22	15 [1])	2	„ erste 8 „	5,762	5,316	0,446	7,75	„ „	+ + +
25. XI. 22	15	3	Vortag: 12 Std.	0,515	0,515	—	—	„ „	— — —
			Probetag: erste 8 Std.	11,646	10,648	0,998	8,57	„ „	+ + +
			zweite 8 Std.	0,369	0,286	0,083	—	„ „	schwach +
			dritte 8 Std.	0,483	0,422	0,061	—	„ „	— — —
21. I. 23	15	4	Vortag: 24 Std.	1,826	1,754	—	—	2,47	— — —
			Probetag: erste 8 Std.	11,037	9,787	1,250	11,3	2,47	+ + +
			zweite 8 Std.	1,611	1,606	—	—	2,47	— — —
			dritte 8 Std.	0,325	0,326	—	—	—	— — —
29. I. 23	15	5	Vortag: 24 Std.	1,136	1,171	—	—	2,47	— — —
			Probetag: erste 8 Std.	10,750	9,951	0,799	7,43	2,47	+ + +
			zweite 8 Std.	0,477	0,472	—	—	2,47	— — —
			dritte 8 Std.	0,387	0,360	—	—	—	— — —
6. II. 23.	15	6	Vortag: 24 Std.	1,541	1,618	—	—	2,47	— — —
			Probetag: erste 8 Std. [2])	6,166	5 677	0,489	7,93	2,00	+ + +
			zweite 8 Std. [2])	5,764	5,317	0,447	7,75	1,23	+ + +
			dritte 8 Std.	0,526	0,537	—	—	2,00	— — —

[1]) Eine halbe Stunde nach Zuführung hat Patient vomiert. — [2]) Verzögerte Ausscheidung von Hippursäure und anderen Benzoesäure-Paarlingen bei Menschen mit normalen Nieren.

Totalquantum Benzoesäure, mit anderen Worten: an andere Stoffe gepaarte Benzoesäure ist im Harn vorhanden. Wie oben bereits angeführt, ist es auf Grund der starken Glucuronsäurereaktionen im Harn wahrscheinlich, daß wenigstens ein Teil dieser Benzoesäure an Glucuronsäure gebunden ist.

Hiermit sind die quantitativen Versuche als beendet zu betrachten.

Die vorstehende Tabelle III weist eine Zusammenfassung der mit den *Kingsbury-Swanson*schen und *Snapper-Laqueur*schen Methoden erhaltenen Resultate auf. Hieraus geht hervor, daß nach Zuführung von 15g benzoesauren Natriums innerhalb einer halben Stunde der größte Teil während der ersten 8 Stunden ausgeschieden wird (80 bis 90 Proz.), ausgenommen Versuch 2: der Patient hat erbrochen, und Versuch 6: es fand langsame Ausscheidung statt. Ferner, daß das Totalquantum Benzoesäure größer ist als das an Glykokoll gepaarte Quantum Benzoesäure.

Dieser Überschuß an Benzoesäure ist, wie wir schon gesehen haben, auch nachzuweisen, wenn die Hippursäure zum größten Teil aus dem Harn entfernt worden ist (mit Mineralsäure); mit anderen Worten: sowohl der native Harn als das Harnfiltrat weisen, mit nur auf Versuchsfehler zurückzuführenden Abweichungen, dasselbe Plus an Benzoesäure auf (s. Tabelle IV).

Schließlich bemerken wir noch bezüglich der Ausscheidung der Benzoesäure-Glucuronsäure-verbindung, daß diese und auch die von eventuell

Tabelle IV.

Ausscheidung von Hippursäure und anderen Benzoesäure-Paarlingen im Harn des Probetages (erste 8 Stunden), zu welchem konzentrierte HNO_3 (2 Proz. des Volumens) zugefügt ist. Der Harn wird während 2 mal 24 Stunden an kühler Stelle aufbewahrt, filtriert und das Harnfiltrat untersucht auf: 1. Totalquantum Benzoesäure nach *Kingsbury-Swanson*. 2. Hippursäure nach *Snapper-Laqueur*. 3. Freie Benzoesäure nach *Wiechowski*.

Datum	Zugeführt g	Probe	Probetag	Totalquantum Benzoesäure g	Benzoesäure als Hippursäure g	Nicht an Glykokoll gepaarte Benzoesäure g	In Proz. ausgedrückt	Nicht an Glykokoll gepaarte Benzoesäure im nativen Harn ohne Zufügung von HNO_3 g	In Proz. ausgedrückt	Freie Benzoesäure mg	Glucuronsäurereaktionen
25. XI. 22	15	1	Harnfiltrat der ersten 8 Stunden	2,605	1,662	0,943	36,2	0,998	8,5	nicht bestimmt	+++
22. I. 23	15	2		3,312	2,133	1,179	35,6	1,250	11,3	2,0	+++
29. I. 23	15	3		2,903	2,180	0,723	24,9	0,799	7,4	1,98	+++
6. II. 23	15	4[1]		2,307	1,774	0,533	23,2	0,489	7,9	3,0	+++

[1]) Verzögerte Ausscheidung von Hippursäure und anderen Benzoesäure-Paarlingen bei Menschen mit normalen Nieren.

an andere Stoffe gebundener Benzoesäure parallel verläuft mit der Hippursäureausscheidung. Dieser Parallelismus behauptet sich auch, wenn die Hippursäureausscheidung verzögert ist.

Ergebnisse.

1. Nach Zuführung von 10 bis 15 g benzoesauren Natriums per os kommt im menschlichen Harn keine freie Benzoesäure vor.

2. Nach Verabfolgung von 10 bis 15 g benzoesauren Natriums entsteht im menschlichen Harn neben der Hippursäure eine andere Substanz, welche mit *Fehling*scher und *Nylander*scher Lösung, sowie mit Naphthoresorcin, Orcin und Phloroglucin positiv reagiert, während zugleich der Harn nach Kochen mit Säure rechts dreht. Diese Substanz ist also als Glucuronsäureverbindung zu betrachten.

3. Von der ausgeschiedenen Benzoesäure sind ungefähr 90 Proz. als Hippursäure, und ungefähr 7½ bis 11 Proz. als eine andere Verbindung — mutmaßlich als *Benzoe-Glucuronsäure* — zugegen.

4. Die Methoden, bei denen die Menge der Hippursäure aus dem Totalquantum Benzoesäure berechnet wird, wie z. B. die von *Kingsbury-Swanson*, ergeben also zu hohe Werte für die Hippursäure.

Literatur.

1) *E. Salkowski*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 25, 1877. — 2) *Derselbe*, ebendaselbst **4**, 135, 1880. — 3) *K. Siebert*, Inaug.-Diss. Königsberg 1901. — 4) *Kobert*, Schmidts Jahrb. **185**, 113, 1880. — 5) *Th. Brugsch* und *R. Hirsch*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **3**, 663, 1906. — 6) *Magnus Levy*, diese Zeitschr. **6**, 502, 1907. — 7) *Jaffe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 374—376, 1904. — 8) *Thierfelder*, ebendaselbst **13**, 275, 1888. — 9) *Wiechowski*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 204, 1906. — 10) *Thierfelder* und *von Mering*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 50, 1883. — 11) *Lewinski*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **58**, 397, 1908. — 12) *Brugsch*, Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. **5**, 731, 1909. — 13) *H. D. Dakin*, Journ. of biol. Chem. **7**, 103—108, 1909. — 14) *J. Tsuchiya*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. **5**, 737, 1909. — 15) *F. Blumenthal*, Malys Jahresberichte **30**, 363, 1910; Zeitschr. f. klin. Med. **40**, 339—344. — 16) *Henriques* und *Sörensen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **63**, 327. — 17) *R. Cohn*, Festschrift für Jaffe **3**, 327, Braunschweig 1901. — 18) *Jaarsveld* en *Stokvis*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **10**, 71, 1879. — 19) *H. Steenbock*, The Journ. of biol. Chem. **11**, 205, 1912. — 20) *Folin* und *Flanders*, ebendaselbst **11**, 1912. — 21) *Kingsbury* and *Swanson*, ebendaselbst **48**, 1921. — 22) *Violle*, Annales de Médecine 1920. — 23) *Lewis*, Journ. of biol. Chem. **18**, 1914. — 24) *Kronecker*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **16**. — 25) *Seo*, ebendaselbst **58**, 440, 1908. — 26) *Schmiedeberg*, ebendaselbst **14**, 379, 1881. — 27) *Minkowski*, ebendaselbst **17**, 44, 1883. — 28) *Wiener*, ebendaselbst **40**, 313, 1897—1898. — 29) *Epstein* und *Buckmann*, Journ. of biol. Chem. **20**, 353. — 30) *Abderhalden* und *Strauss*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **91**, 81, 1914. — 31) *Kingsbury* and *Bell*, Journ. of biol. Chem. **20**, 373, 1915. — 32) *Van de Velde* und *Stokvis*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **17**, 189, 1883. — 33) *Weyl* und *Anrep*,

Zeitschr. f. physiol. Chem. **4**, 169, 1880. — 34) *Henneberg*, Mitt. d. landw. Inst. d. Univ. Breslau **2**, 273, 1904. — 35) *Wreden*, Chem. Centralbl. 1859, S. 552. — 36) *Loebisch*, Loebisch Anleitung zur Harnanalyse, 2. Aufl., S. 133. — 37) *Cazeneuve*, ebendaselbst, S. 133. — 38) *Blumenthal*, Zeitschr. f. klin. Med. **40**, 339—344. — 39) *Pfeiffer*, *Bloch* und *Riecke*, Mitt. d. landw. Inst. d. Univ. Breslau **2**, 292, 1904. — 40) *Rem-Picci*, Zeitschr. f. Tierchem. 1903, S. 316. — 41) *P. Mayer* und *C. Neuberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**, 256, 1900. — 42) *C. Neuberg* und *S. Saneyoshi*, diese Zeitschr. **36**, 56, 1911. — 43) *Bunge* und *Schmiedeberg*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **10**, 1876. — 44) *Lewis*, Journ. of biol. Chem. **18**, 1914. — 45) *Blumenthal* und *Braunstein*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **8**, 1903. — 46) *Th. Hryntschak*, diese Zeitschr. **48**, 315. — 47) *Snapper* et *Laqueur*, Extrait des Archives néerlandaises **6**, 1921; diese Zeitschr. 1924. — 48) *Raiziss* and *Dubin*, Journ. of biol. Chem. **21**, 331, 1915. — 49) *Soetbeer*, Zeitschr. f. klin. Med. **40**. — 50) *E. Remy*, Apotheker-Ztg. **26**, 835, 1911. — 51) *A. W. van der Haar*, diese Zeitschr. **88**, 205, 1918. — 52) *E. Baumann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 123, 1885. — 53) *J. Snapper*, Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 2e Helft, No. 19, 1921. 54) *J. Snapper*, *A. Grünbaum* und *J. Neuberg*, diese Zeitschr. 1924. — 55) *J. Neuberg*, De Stofwisseling van het Benzoezuur in het Menschelyk Organisme. Dissertation bei *Snapper*. Amsterdam 16. Mai 1923.

Über die Reizwirkung der Nahrung auf intermediäre Stoffwechselvorgänge. I.

Von

Wilhelm Laufberger und **J. A. Šefčik.**

(Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie an der Masaryk-Universität zu Brünn.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1923.)

Die Arbeiten *Pawlows* und seiner Schüler haben den großen Einfluß der Nahrung auf die Tätigkeit der Verdauungsdrüsen gezeigt. Die durch den Reiz der eingeführten Nahrung ausgelöste Sekretion der Verdauungsdrüsen ist in sehr feiner und sehr vollkommener Weise — sowohl qualitativ als auch quantitativ — angepaßt der Zusammensetzung und Menge der zu verarbeitenden Stoffe. Doch wird sich dieser Einfluß der Nahrung wohl nicht nur auf die äußere Arbeit der Verdauungsdrüsen beschränken, deren leichtere Zugänglichkeit eine meisterhafte Behandlung ermöglicht hat, sondern muß sich vielmehr auch auf die innere Arbeit dieser Organe erstrecken. Um einem Mißverständnis aus dem Wege zu gehen, müssen wir betonen, daß uns dabei nicht jene selbstverständlichen unzähligen Stoffwechselvorgänge vor Augen schweben, die durch die Nahrungszufuhr und die darauf folgende Sekretion in den Verdauungsdrüsen ausgelöst werden, sondern vielmehr bloß der Teil dieser, der gewissermaßen die Vorbereitung des Organs für diese Stoffwechselvorgänge darstellt. So wie sich auf psychischem Wege der Magensaft schon vor der Berührung mit der Nahrung auf die Verdauung von Fleisch und anderen Nahrungsmitteln einstellt, so muß sich auch der intermediäre Stoffwechsel auf die folgenden Vorgänge vorbereiten, wobei irgend ein Reiz seine Änderung auslöst. Die Forschung muß sich vor allem darauf beschränken, festzustellen, ob Vorgänge, die als solche Vorbereitungen gedeutet werden könnten, sich überhaupt abspielen, ferner welcher Art sie sind und durch welchen Mechanismus sie ausgelöst werden. Der Forschung erschließt sich hier also ein Weg zur Lösung der Probleme des intermediären Stoffwechsels, der bis jetzt nur von wenigen betreten wurde, unter denen *Gottschalk*[1]) genannt werden muß.

---

[1]) *Gottschalk*, Klin. Wochenschr. **30**, 1923.

Unsere Versuche führten wir an Kaninchen durch, denen die Nahrung in den Magen eingeführt wurde, worauf in kurzen Intervallen der Blutzucker bestimmt wurde. Unsere Versuche untersuchten den Einfluß von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißstoffen. Außerdem stellten wir noch Kontrollversuche an. Da der Einfluß oraler Kohlenhydratzufuhr auf die Blutzuckerkurve allgemein bekannt ist und sich außerdem unsere Versuchsergebnisse vollkommen mit denen anderer Autoren decken, so wäre ihre Anführung an dieser Stelle überflüssig. Dagegen wurde der Einfluß oraler Proteinzufuhr weniger oft einer Untersuchung unterzogen. Die wenigen vorliegenden Versuche dieser Art ergaben zudem meistens ein negatives Resultat [*Bing* und *Jakobsen*, *Folin* und *Berglund*, *Rosenberg*[1])]. Diese Versuche wurden allerdings an Menschen ausgeführt, wobei die Blutproben nach ziemlich langen Zeitabständen entnommen wurden. Außerdem kann man gegen diese Versuche noch einwenden, daß beim Menschen selbst ein so geringer Reiz, wie es eine Blutentnahme ist, eine Hyperglykämie auslöst. Nur das Kaninchen ist ein geeignetes Objekt für Versuche, welche mit Blutzuckerbestimmungen einhergehen, wie das auch unsere Kontrollversuche beweisen. Zufuhr von Fetten hat nach *Jakobsen* keinen Einfluß auf den Blutzucker.

Unsere Methodik war folgende:

Das Versuchstier wurde angebunden, die erste Blutprobe entnommen, und mit Hilfe eines in den Schlund eingeführten Ureteralkatheters die bei den einzelnen Versuchsreihen angeführte Menge des untersuchten Stoffes eingeführt. Hierauf wurden die weiteren Blutproben gewöhnlich in 5, 15, 30, 60 Minuten, bei einzelnen Versuchen wurde auch noch nach der ersten Stunde entnommen. Zur Analyse diente das neue Verfahren von *Bang*, mit welchem stets Doppelbestimmungen unternommen wurden. Die Tiere hungerten vor jedem Versuche 24 Stunden.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Kaninchen Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Zeit 0′	5′	15′	30′	60′
				Zucker Proz.				
41	16	♀	3410	0,113	0,114	0,098	0,11	0,092
42	13	♂	2330	0,116	0,113	0,119	0,118	0,099

Kontrollversuche: Die Tiere wurden angebunden, die erste Blutprobe entnommen und der Katheter in den Schlund eingeführt, doch keine Lösung eingespritzt.

[1]) *Folin* und *Berglund*, Journ. of biol. Chem. **51**, 1922; *Rosenberg*, Klin. Wochenschr. **20**, 1923; *Bing* und *Jakobsen*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **118**, 1914.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Kaninchen Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Zeit 0′	10′	20′	50′	90′	140′	200′
				Zucker Proz.						
10	3	♂	2410	0,119	0,111	0,146	0,123	0,121	0,125	0,129
13	21	♀	2150	0,106	0,119	0,120	0,097	0,147	0,119	0,135

Versuch mit Eiereiweiß: Es wurden 20 ccm Eiereiweiß eingespritzt.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Kaninchen Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Zeit 0′	5′	10′	15′	20′	30′	50′
				Zucker Proz.						
11	6	♂	1480	0,127	—	0,152	—	0,148	—	0,166
12	11	♂	2500	0,099	—	0,114	—	0,133	—	0,144
26	3	♂	2600	0,092	0,142	—	0,131	—	—	—
30	5	♂	2390	0,086	0,107	—	0,103	—	0,115	—
31	10	♀	2500	0,09	0,104	—	0,119	—	0,098	—
43	4	♀	3220	0,091	0,111	—	0,102	—	0,089	—
46	3	♂	3110	0,095	0,124	—	0,107	—	0,095	—
47	7	♀	2130	0,116	0,124	—	0,139	—	0,12	—

Versuch Nr.	Kaninchen Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Zeit 60′	90′	120′	140′	180′	200′	240′
				Zucker Proz.						
11	6	♂	1480	—	0,141	—	0,134	—	0,138	—
12	11	♂	2500	—	0,131	—	0,124	—	0,119	—
26	3	♂	2600	0,114	—	—	—	—	—	—
30	5	♂	2390	0,119	—	—	—	—	—	—
31	10	♀	2500	0,099	—	—	—	—	—	—
43	4	♀	3220	0,091	0,101	0,091	—	0,088	—	0,086
46	3	♂	3110	0,095	0,087	0,101	0,085	0,073	—	—
47	7	♀	2130	0,117	0,113	0,116	—	—	—	—

Versuche mit Pepton: Verwendet wurden 20 ccm einer 25proz. Lösung; das verwendete Pepton reduzierte *Fehling*sche Lösung nicht.

Tabelle IV.

Versuch Nr.	Kaninchen Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Zeit 0′	5′	15′	30′	60′
				Zucker Proz.				
44	10	♂	2520	0,08	0,088	0,092	0,083	0,081
45	9	♂	2670	0,083	0,088	0,083	0,086	0,085

Versuche mit Fett: Es wurden 20 ccm Olivenöl eingeflößt.

Aus den Kontrollversuchen ist ersichtlich, daß der durch das Einführen des Katheters bewirkte mechanische Reiz keine Hyperglykämie auslöst. Das Olivenöl verhält sich ebenfalls ganz indifferent.

Im Gegensatz hierzu weist der Blutzucker der mit Pepton behandelten Tiere eine Erhöhung auf. Der angeführte Versuch mit Eiereiweiß verhält sich ganz ähnlich. Die hier angeführten Versuche stellen nur eine Auswahl dar, da das weitere uns vorliegende Versuchsmaterial in keiner Hinsicht von dem angeführten abweicht und seine Veröffentlichung somit überflüssig wäre. Die beobachtete Erhöhung ist zwar nicht bedeutend — sie erreicht im Versuche 11 1,66 Prom. — aber doch in allen Versuchen deutlich ausgesprochen. Immerhin ist eine gewisse Unregelmäßigkeit im Verlaufe der Blutzuckerkurven vorhanden, die sich in ihrer verschiedenen Höhe und Länge äußert. So ist im Versuche 12 die Erhöhung des Blutzuckers nach 140 Minuten noch deutlich, während sie in den meisten Fällen schon nach 30 Minuten abgeklungen ist. Auffallend ist aber der regelmäßige Beginn, der sehr früh, schon im Verlaufe der ersten 5 Minuten sich einstellt.

Es ist klar, daß man das Ergebnis dieser Versuche nur durch eine Reizwirkung der eingeführten Nahrung erklären kann. Die Blutzuckererhöhung bei Kohlenhydratzufuhr per os konnte man doch noch durch Resorption des Zuckers erklären und sie somit als Transporthyperglykämie bezeichnen. Ein solcher Einwand kann bei unseren Versuchen nicht gemacht werden, da, wie übrigens schon erwähnt wurde, das verwendete Pepton *Fehling*sche Lösung nicht reduzierte. Andererseits erfordert aber eine Befreiung der Kohlenhydratkomponente der Eiweißstoffe immerhin eine länger dauernde Verdauungsarbeit. Es ist also durchaus unwahrscheinlich, daß die Erhöhung des Blutzuckers durch Resorption aus dem Darme zustande kommt, da der Blutzucker bereits 5 Minuten nach der Einführung der Nahrung erhöht ist. Die nicht veränderte Höhe des Blutzuckers bei den Kontroll- und Fettversuchen beweist, daß die Hyperglykämie nicht durch einen mechanischen Reiz oder durch Muskelarbeit verursacht ist, denn letztere ist bei der Verdauung von Fetten sicher ebenso groß wie bei der Verdauung anderer Stoffe. Auch indirekt durch Nervenreizung läßt sie

sich nicht erklären, wie besonders die Kontrollversuche dartun. Deshalb muß man aus diesen Versuchen den Schluß ziehen, daß den Proteinkörpern bei Verabreichung per os eine Reizwirkung auf den Blutzucker zukommt. Indirekt sprechen diese Versuche auch für die Meinung jener Autoren, die die Hyperglykämie nach Kohlenhydratzufuhr als Reizhyperglykämie aufgefaßt wissen wollen.

Die Frage nach der Art der diese Hyperglykämie auslösenden Reizung — ob sie hormonal oder nervös bedingt ist —, kann erst durch weitere in dieser Richtung unternommene Versuche gelöst werden.

Zusammenfassung.

Bei oraler Zufuhr von Pepton oder Eiereiweiß entsteht eine Hyperglykämie von wechselnder Dauer schon innerhalb der ersten 5 Minuten. Mechanische Reizung der Magenschleimhaut und Zufuhr von Olivenöl haben keinen Einfluß auf die Blutzuckerkurve.

Zur Theorie der Thrombinwirkung.

IX. Mitteilung:

Über Blutgerinnung.

Von

Edgar Wöhlisch.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 25. Dezember 1923.)

Wegen der verwirrenden Fülle einander widersprechender Hypothesen und Befunde, die heute noch das Eindringen in die interessanten Fragen der Blutgerinnungsphysiologie so außerordentlich erschwert, hat sich der Verfasser, um eine allmähliche Klärung wenigstens der wichtigsten Punkte herbeizuführen, neben der Bearbeitung des Gebietes nach eigenen Gesichtspunkten eine systematische Nachprüfung der von anderen Autoren angegebenen, für das Problem bedeutungsvoll erscheinenden Befunde zur Aufgabe gemacht.

Erst vor kurzem berichtete ich gemeinsam mit *Paschkis*[1]) über Untersuchungen in der Frage nach der Spezifität der Kalksalze, die zu dem Ergebnis einer völligen Bestätigung der — neuerdings von *Vines*[2]) sowie von *Stuber* und *Sano*[3]) bestrittenen — *Pekelharing-Hammarsten*schen Lehre führten, nach welcher die Anwesenheit ionisierten Kalkes für die Phase der Thrombinbildung unbedingt notwendig ist. Eine ausführlichere Darstellung unserer Versuche ist im Druck und erscheint demnächst in der Zeitschr. f. d. ges. exper. Med.

Auch über die Natur und Wirkungsweise des Thrombins ist vor kurzem eine neue Lehre von *Stuber* und *Sano*[4]) aufgestellt worden, mit der sich die Überlegungen und Versuche dieser Mitteilung befassen sollen.

Nach der älteren Lehre bildet sich bei Berührung des Blutes mit Fremdkörpern in Gegenwart von Ca-Ionen ein die Ausfällung des Fibrinogens bewirkender Stoff, eben das von *A. Schmidt* entdeckte und von ihm als Ferment angesprochene Thrombin. Dieser Stoff, dem auch das Serum seine gerinnungsauslösenden Eigenschaften verdankt, läßt sich nach einem Verfahren *A. Schmidts* durch Alkoholfällung aus dem Serum gewinnen, indem man das Präzipitat trocknet, fein pulverisiert und in Wasser oder Salzlösung aufschwemmt. Die durch Abfiltrieren des Ungelösten gewonnene

---

[1]) *Wöhlisch* und *Paschkis*, Klin. Wochenschr. **2**, 1930, 1923.

[2]) *Vines*, Journ. of physiology **55**, 86, 1921.

[3]) *Stuber* und *Sano*, diese Zeitschr. **134**, 260, 1923.

[4]) *Dieselben*, ebendaselbst, S. 239.

wasserklare Lösung hat stark gerinnungsaktive Eigenschaften, die dem auf diese Weise einigermaßen rein dargestellten Thrombin zugeschrieben wurden.

Stuber und *Sano* kommen nun auf Grund ihrer Versuche zu einem wesentlich anderen Ergebnis. Sie glaubten zeigen zu können, daß eine in der beschriebenen Weise hergestellte *Schmidt*sche Thrombinlösung auch dann die Gerinnung einer Fibrinogenlösung herbeiführe, wenn sie von dieser durch eine für das Thrombin nicht durchgängige Membran getrennt werde. Sie ziehen hieraus den Schluß, das *Schmidt*sche Thrombin könne kein Ferment sein, und ferner müsse seine Wirkungsweise von der des Serums verschieden sein, denn soviel bisher bekannt, wirkt ja das Serum nicht durch eine Membran hindurch. Das *Schmidt*sche Verfahren gestattet also nach *Stuber* und *Sano* gar nicht die Isolierung des bei der Gerinnung wirksamen Serumstoffes; das *Schmidt*sche Thrombin, dessen Entdeckung bisher als eine der wichtigsten Leistungen in der Gerinnungsphysiologie angesehen wurde, ist nach den Autoren ein biologisch bedeutungsloses Kunstprodukt. Die gerinnungsauslösende Wirkung dieses Stoffes erklärt sich nach *Stuber* und *Sano* durch dessen Natur als ein durch Alkoholdenaturation gewonnener Eiweißkörper: dieser soll durch seine Quellungstendenz dem Fibrinogen sein Wasser entziehen und dadurch dessen Gerinnung bewirken.

Bei der außerordentlichen Wichtigkeit des Gegenstandes für die Gerinnungsphysiologie wollen wir uns nunmehr mit der *Stuber-Sano*schen Beweisführung an der Hand eigener Versuche auseinandersetzen.

Die folgenden schwerwiegenden Bedenken lassen eine Nachprüfung der *Stuber-Sano*schen Untersuchungen dringend geboten erscheinen:

1. Ein Befund, der mit großer Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der alten Lehre von der Identität des gerinnungsaktiven Serumstoffes und des *Schmidt*schen Thrombins spricht, ist der von *Schmidt* erbrachte Nachweis, daß man aus Blut, das man direkt in Alkohol auffängt — in welchem es also gar nicht erst zum Ablaufen des Gerinnungsvorganges kommt —, kein Thrombin gewinnen kann, da dieses sich nach *A. Schmidt* eben erst während der Gerinnung bildet. Dieser Befund *A. Schmidts*, den *Stuber* und *Sano* nicht erwähnen, ist nach der Thrombinlehre dieser Autoren nicht verständlich, da das frische Blut mit Alkohol ebensogut ein denaturiertes Eiweißpräzipitat ergibt wie das bereits geronnene.

2. Es gibt eine Substanz — das aus den Mundwerkzeugen des Blutegels darstellbare Hirudin —, welche, soviel man weiß, die Blutgerinnung dadurch verhindert, daß sie in spezifischer und quantitativer Weise das Thrombin unwirksam macht, und zwar sowohl das des frischen Serums, wie auch das aus diesem nach *A. Schmidt* hergestellte — ein Befund, der sich nach der *Stuber-Sano*schen Lehre ebenfalls nicht verstehen läßt, während es nach der klassischen Lehre gar nicht anders sein kann. Auch dieser wichtige Befund ist von *Stuber* und *Sano* nicht diskutiert worden.

3. Die *Stuber-Sano*sche Annahme, daß der Quellungsdruck der Thrombinlösung die treibende Kraft bei der Auslösung der Gerinnung sei, ist aus physikalisch-chemischen Gründen sehr unwahrscheinlich. Der Quellungsdruck ist ja im wesentlichen abhängig von dem Eiweißgehalt der Lösung, dieser ist aber selbst bei einer stark wirksamen — filtrierten — Thrombinlösung sehr gering, er beträgt nur einige Promille. Man kann sich nach allem in diesen Dingen bisher Bekannten nur sehr schwer vorstellen, daß eine derartig stark verdünnte Eiweißlösung noch einen so hohen Quellungsdruck ausüben soll, daß sie dadurch einer sehr viel größeren Menge Fibrinogens ihr Lösungswasser entzieht. Man hätte es alsdann in dem Thrombin mit einem Eiweißkörper von ganz abnormen und extremen Eigenschaften zu tun, zu dem ein Analogon bisher nicht bekannt ist.

4. Die eigenen Daten der beiden Autoren sprechen unbedingt gegen die Richtigkeit ihrer Annahme: *Stuber* und *Sano* haben versucht, den von ihrer Quellungshypothese geforderten Druckanstieg in der Thrombinlösung während der Gerinnung auch quantitativ festzustellen, indem sie die Thrombinlösung mit einem *Szigmondy*schen Osmometer in Verbindung brachten. Sie beobachteten in ihren Versuchen während der Gerinnung ein Steigen der Wassersäule in dem Osmometerrohr um 1 bis 2 mm! Die hierbei von der Fibrinogenlösung zum Thrombin übergetretene Wassermenge, die wegen des meist engen Lumens derartiger Osmometerröhren nur sehr klein sein kann, ist es also angeblich, durch deren Entziehung die Gerinnung der — dazu wahrscheinlich noch nicht einmal maximal konzentrierten — Fibrinogenlösung bewirkt werden soll. Auf die völlige Unwahrscheinlichkeit einer derartigen Vorstellung habe ich bereits früher[1]) hingewiesen.

Ich komme nunmehr zur Besprechung meiner eigenen Versuche, die zur Aufklärung der *Stuber-Sano*schen Befunde dienen sollen. Es ist ein einfaches physikalisches Postulat der Quellungshypothese der beiden Autoren, daß der Quellungsdruck einer *Schmidt*schen Thrombinlösung wesentlich größer sein müsse als der eines Serums, da ja das Thrombin im Gegensatz zum Serum auch durch eine Membran hindurch eine Entquellung des Fibrinogens zustande bringen soll. Auf meine Veranlassung haben nun Herr Prof. *Schade* und Herr Dr. *Clausen*[2]) mit einer von dem ersteren für seine Zwecke selbst konstruierten ingeniösen Apparatur eine Messung des Quellungsdruckes einer stark gerinnungsaktiven Thrombinlösung vorgenommen. Es ergab sich der Wert 0, d. h. der Druck war so gering, daß er unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze der Apparatur lag. Für ein normales Serum findet man dagegen

[1]) *Wöhlisch*, Klin. Wochenschr. 2, 2318, 1923.

[2]) Ich möchte den beiden Herren an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

mit derselben Apparatur Werte in der Größenordnung von etwa 25 mm Hg.

Der Ausfall der Messung bestätigt also vollkommen unsere Erwartungen, und es ist hiermit experimentell gezeigt, daß der Quellungsdruck des Thrombins als Erklärung für den Ausfall der *Stuber-Sano*schen Membranversuche nicht herangezogen werden kann.

Es gab jedoch noch eine zweite Möglichkeit, den Ausfall der Versuche zu deuten: *Herzfeld* und *Klinger*[1]) führen nämlich unter den Grundversuchen für ihre Gerinnungstheorie einen sehr merkwürdigen Befund an, der im Falle der Richtigkeit in der Tat von fundamentaler Bedeutung für die Gerinnungstheorie hätte werden müssen. Man soll nämlich nach diesen Autoren eine Fibrinogenlösung durch einfache Dialyse gegen eine gleichprozentige Kochsalzlösung zur Gerinnung bringen können; sie schließen hieraus auf eine dialysable, die Lösungsstabilität des Fibrinogens bedingende Substanz, durch deren Entziehung es zur Ausflockung des Fibrinogens kommt. Man könnte sich nun denken, daß das *Schmidt*sche Thrombin die Fähigkeit habe, diese Substanz zu binden. Eine Thrombinlösung als Außenflüssigkeit des Dialysators müßte dann wirken wie eine ständige Frischhaltung der von *Herzfeld* und *Klinger* in ihrem Versuche als Außenflüssigkeit verwendeten Kochsalzlösung — es müßte zur Gerinnung des seiner stabilisierenden Hülle beraubten Fibrinogens kommen. Nun haben jedoch *Stuber* und *Sano* die *Herzfeld-Klinger*schen Versuche nicht bestätigen können: sie erhielten niemals eine Gerinnung des Fibrinogens durch Dialyse gegen Kochsalzlösung.

Zur Klärung des Widerspruches habe ich auch hier eine Nachuntersuchung vorgenommen, deren Resultat ich bereits in der Klinischen Wochenschrift 2, 1801, 1923 kurz besprochen habe. Die Dinge liegen folgendermaßen: Bei Verwendung von *Schleicher-Schüll*schen Pergamenthülsen als Dialysator erhielt ich in der Tat unter Umständen eine starke Flockung, manchmal schon nach etwa 12 Stunden. Durch Anstellung der von *Herzfeld* und *Klinger* unterlassenen Kontrollen läßt sich aber zeigen, daß diese Flockung mit der Dialyse nichts zu tun hat: man erhält die Flockung nämlich auch, wenn man die mit Fibrinogen gefüllten Hülsen *ohne Außenflüssigkeit* aufbewahrt, oder wenn man als *Außenflüssigkeit dieselbe Fibrinogenlösung* verwendet, in der es dann auch außen zur Flockung kommt. Die Flockung ist also eine Wirkung der Pergamentmembran, nicht der Dialyse. Auch bei Verwendung von Kollodiummembranen beobachtet man bisweilen Flockungen, jedoch erst nach sehr viel längerer Zeit. Verschiedene

---

[1]) *Herzfeld* und *Klinger*, diese Zeitschr. 71, 391, 1915.

Fibrinogenlösungen können sich in derartigen Versuchen, je nach ihrem Stabilitätsgrade, sehr unterschiedlich verhalten.

Nicht erklärlich ist mir die Angabe von *Stuber* und *Sano*, daß sie auch bei Dialyse gegen destilliertes Wasser an ihren Fibrinogenlösungen keine stärkere Flockung beobachtet haben wollen.

Wie dem auch sei, jedenfalls beruht das Versuchsresultat von *Herzfeld* und *Klinger* und damit ihre Annahme eines *dialysablen* Fibrinogenstabilisators auf einem Irrtum und kommt also für eine Deutung der *Stuber-Sano*schen Befunde nicht in Betracht.

Bei dieser Sachlage schien der Verdacht naheliegend, daß beim Zustandekommen der *Stuber-Sano*schen Resultate eine unbekannte Fehlerquelle mitgewirkt und die Gerinnung des Fibrinogens unter dem Einfluß des durch eine Membran von diesem getrennten Thrombins lediglich vorgetäuscht haben könnte.

Diese Annahme wird noch wahrscheinlicher, wenn man sich die Versuche daraufhin näher ansieht. Es fehlen nämlich bei sämtlichen Versuchen die Kontrollen ohne Verwendung von Thrombin als Außenflüssigkeit. *Stuber* und *Sano* glaubten diese unterlassen zu können, weil sie bei ihren Dialysierversuchen von Fibrinogen gegen Salzlösungen und gegen destilliertes Wasser niemals eine eigentliche Gerinnung beobachtet hatten. Meines Erachtens hätten die Kontrollen trotzdem nicht unterbleiben dürfen, da sich, wie gesagt, verschiedene Fibrinogenlösungen in derartigen Versuchen sehr unterschiedlich verhalten können.

Ich komme nunmehr zur Besprechung meiner Nachprüfung der *Stuber-Sano*schen Ergebnisse.

Ich weiche von diesen Autoren darin ab, daß meine Versuche mit Rinder- oder Menschenfibrinogen angestellt wurden, während *Stuber* und *Sano* mit Pferdefibrinogen arbeiteten. Ferner verzichtete ich absichtlich auf die sonst bei der Darstellung von Fibrinogenlösungen meist übliche und auch von *Stuber* und *Sano* angewandte mehrmalige Umfällung des Fibrinogens, da hierdurch, wie auch *Herzfeld* und *Klinger* beobachtet haben, die Stabilität der Lösungen stark leiden kann. Bei der Herstellung von Fibrinogen aus Rinderblut befolgte ich das von den eben erwähnten beiden Autoren angegebene Verfahren, das darin besteht, daß man dem mit Kochsalz halbgesättigten Plasma noch etwas gesättigte Ammonsulfatlösung — etwa $^1/_{10}$ des Gesamtvolumens — zusetzt, da man allein durch Halbsättigung mit Kochsalz aus Rinderplasma keinen Fibrinogenniederschlag erhält. Die Lösung des Niederschlages erfolgte stets in 0,85proz. Kochsalzlösung.

Als Dialysatoren wurden kleine Glaszylinder von 2 cm Durchmesser verwendet, die unten durch selbst hergestellte Kollodiummembranen verschlossen waren. Die Membranen waren vor dem Versuche auf Undurchlässigkeit für Eiweiß geprüft.

Das Thrombin war in der üblichen Weise aus Pferdeserum nach *A. Schmidt* gewonnen. Es wurde in destilliertem Wasser oder in 0,85proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt; die nach etwa einer Stunde durch Filtration gewonnene klare Lösung wurde in den Versuchen verwendet.

Versuch 1.

Fibrinogenlösung aus Rinderblut, **Thrombin in wässeriger Lösung.**

Dialysatorinhalt: 1,0 ccm Fibrinogenlösung.

Außenflüssigkeit: 2,0 ccm wässerige Thrombinlösung für den eigentlichen Versuch, 2,0 ccm Aqua dest. für die Kontrollen

Es wurden je vier Membranen für den Thrombinversuch bzw. für die Kontrollen verwendet.

Ergebnis: Der Versuch wurde abends angesetzt. Am nächsten Morgen war in allen acht Dialysatoren vollständige Gerinnung eingetreten. Der Rest der Fibrinogenlösung, der in einem Reagenzglase aufbewahrt war, erwies sich als völlig klar und flüssig.

Versuch 2.

Fibrinogenlösung aus Rinderblut, **Thrombin in wässeriger Lösung.**

Dialysatorinhalt: 1,5 ccm Fibrinogenlösung.

Außenflüssigkeit: 2,0 ccm Thrombinlösung für den eigentlichen Versuch, 2,0 ccm Aqua dest. für die Kontrollen.

Je zwei Dialysatoren für den Thrombinversuch bzw. für die Kontrollen.

Ergebnis: In den Kontrollen sind nach 20 Stunden zahlreiche Flocken bemerkbar, in dem Thrombinversuch tritt eine Flockung erst nach 44 Stunden auf.

Versuch 3.

Fibrinogenlösung aus Rinderblut, **Thrombin in 0,85proz. Kochsalzlösung.**

Dialysatorinhalt: 1,0 ccm Fibrinogenlösung.

Außenflüssigkeit: 2,0 ccm Thrombinlösung bzw. 2,0 ccm 0,85proz. NaCl-Lösung für die Kontrollen.

Je drei Dialysatoren für den Thrombinversuch bzw. für die Kontrollen.

Ergebnis: Nach 48 Stunden findet sich in allen sechs Gläsern bei Betrachtung gegen helles Lampenlicht eine feine staubartige Trübung, dagegen nirgends eine Spur eigentlicher Flockung oder Gerinnung. Irgend ein Unterschied zwischen den Thrombinversuchen und den Kontrollen besteht nicht. Der Versuch wird darauf abgebrochen, und die als Außenflüssigkeit dienende Thrombinlösung wird zur Prüfung auf ihre Gerinnungsaktivität der Fibrinogenlösung im Dialysator zugegeben. Es tritt überall feste Gerinnung ein.

Versuch 4.

Fibrinogenlösung aus Rinderblut, **Thrombin in 0,85proz. Kochsalzlösung.**

Dialysatorinhalt: 1,5 ccm Fibrinogenlösung.

Außenflüssigkeit: 2,0 ccm Thrombinlösung bzw. 2,0 ccm 0,85proz. Kochsalzlösung für die Kontrollen.

Je zwei Dialysatoren für den Thrombinversuch bzw. für die Kontrollen.

Ergebnis: Die eine Kontrolle beginnt bereits nach 24 Stunden auszuflocken, die zweite Kontrolle sowie die Fibrinogenlösungen des Thrombin-

versuchs in ganz gleicher Weise nach 48 Stunden. Die nach Abbruch des Versuchs vorgenommene Prüfung der verwendeten Thrombinlösung auf Gerinnungsaktivität fällt positiv aus.

Versuch 5.

Fibrinogenlösung aus Menschenblut. **Thrombin in 0,85 proz. Kochsalzlösung.**

Dialysatorinhalt: 1,5 ccm Fibrinogenlösung.

Außenflüssigkeit: Je 4 ccm Thrombinlösung bzw. 4,0 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung für die Kontrollen. Die Thrombinlösung wird nach 48 Stunden erneuert.

Je zwei Dialysatoren für den Thrombinversuch und für die Kontrollen.

Ergebnis: In keinem der vier Dialysatoren findet sich nach 72 Stunden die Andeutung einer Gerinnung.

Die nach Abbruch des Versuchs vorgenommene Prüfung der verwendeten Thrombinlösung auf Gerinnungsaktivität fällt positiv aus.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Versuche sind völlig eindeutig ausgefallen. Es fand sich in keinem der Versuche ein Unterschied des eigentlichen Thrombinversuchs gegenüber den Kontrollen, wie man ihn nach den *Stuber-Sano*schen Angaben hätte erwarten müssen. Im Gegenteil wurde bisweilen ein früheres Auftreten der Flockung in den Kontrolldialysatoren beobachtet. Ich komme also zu dem Ergebnis, daß eine *Schmidt*sche Thrombinlösung in einer Fibrinogenlösung keine Gerinnung zu bewirken vermag, wenn sie von dieser durch eine für das Thrombin nicht permeable Membran getrennt ist. Es liegt somit meines Erachtens kein Grund vor, an der Identität des Thrombins des frischen Serums und des aus diesem nach *A. Schmidt* durch Alkoholfällung gewonnenen Thrombins zu zweifeln. Das dem meinen entgegengesetzte Ergebnis von *Stuber* und *Sano* erklärt sich meines Erachtens durch die von diesen Autoren unterlassene Anstellung genauer Kontrollen.

Zusammenfassung.

Auf Grund eigener Versuche wird die These von *Stuber* und *Sano*, nach welcher der gerinnungsauslösende Stoff des frischen Serums und das aus diesem durch Alkoholfällung hergestellte *Schmidt*sche Thrombin völlig wesensverschiedene Dinge sind, abgelehnt.

Die Angaben der beiden Autoren, das *Schmidt*sche Thrombin habe die Fähigkeit, die Gerinnung einer Fibrinogenlösung auch dann zu bewirken, wenn es von dieser durch eine für das Thrombin nicht permeable Membran getrennt werde, haben sich nicht bestätigen lassen

Studien über Leberkatalase.

Von

Samuel Hennichs.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Eingegangen am 27. Dezember 1923.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Die Charakteristik der seit der grundlegenden Mitteilung *O. Loews*[1]) oft bearbeiteten Katalase bedarf hauptsächlich in zwei Punkten einer wesentlichen Ergänzung, indem

1. die *Affinität* dieser Enzyme zu dem dazugehörenden Substrat noch nicht ermittelt worden ist und die bisher vorliegenden Messungen nicht ausreichen, um die Konstante

$$K_M = \frac{[\text{Enzym-Substrat}]}{[\text{Enzym}] \times [\text{Substrat}]}$$

mit genügender Genauigkeit zu berechnen, und

2. unsere Kenntnis über die Stabilität der Katalase noch sehr lückenhaft ist und besonders die Frage offen läßt, ob und mit welcher Genauigkeit sich die Stabilität dieses Enzyms durch die Konstante erster Ordnung k_C darstellen läßt[2]).

Auf Veranlassung von Herrn Prof. *v. Euler* und unter dessen Leitung habe ich die Bearbeitung dieser beiden Punkte in Angriff genommen und kann über die erhaltenen Resultate folgende Mitteilungen machen.

Bemerkungen über die Reinigung der Leberkatalase.

Aus früheren Arbeiten, besonders aus denjenigen von *Batelli* und *Stern*[3]), sowie aus der im Laboratorium *Willstätters* ausgeführten Dissertation von *Madinaveitia*[4]) geht hervor, daß die Leber und das

---

1) *O. Loew*, U. S. Dep. of Agric. Rep. **68**, 1901.

2) Siehe *Euler*, Chem. d. Enzyme, 2. Aufl., 1. Tl., S. 174ff.

3) *Batelli* und *Stern*, C. r. **138**, 923; Soc. Biol. **57**, 374, 1904.

4) *Madinaveitia*, Diss. Zürich 1912.

Blut höherer Tiere ein besonders günstiges Ausgangsmaterial für Katalase bilden, wenn es sich darum handelt, hochaktive Präparate darzustellen. Von den genannten Autoren sowie von *Sörensen*[1]) und von *Wolff* und *Stöcklin*[2]) ist auch die Reinigungsmethodik der Katalase eingehend bearbeitet worden, und besonders ist die Einführung der Sorptionsmethoden unter Anwendung von Kaolin, Talk, Kohle und Tristearin bemerkenswert, wenn auch *Madinaveitia* die Elution des Enzyms noch nicht erfolgreich gestalten konnte.

Der erste Versuch zu einer quantitativen Angabe der Aktivität der Katalase findet sich in der Arbeit von *Euler*[3]), welcher seinerzeit die Wirksamkeit des kolloidalen Platins als Einheit wählte und für dieses sowie für ein Präparat von Fettkatalasen die Aktivität pro Gramm Trockengewicht berechnete. Nach dem gleichen Prinzip hat dann *Madinaveitia* seine Tabelle aufgestellt (s. die erste Zahlenspalte der folgenden Tabelle). Bei dem gegenwärtigen Stande der Enzymforschung dürfte es sich empfehlen, nach einem späteren Vorschlage von *Euler* und *Josephson*[4]) die katalytische Fähigkeit der Katalase, Kat.f., durch den Quotienten aus der Reaktionskonstante der Wasserstoffsuperoxydspaltung k und der angewandten Enzymmenge bzw. dem Trockengewicht der Enzymlösung zu charakterisieren. Somit ist zu setzen

$$\text{Kat.f.} = \frac{\text{Reaktionskonst. } k}{\text{g Enzympräparat}}.$$

Die Wirksamkeit der verschiedenen Katalasepräparate.

Präparat	Erforderliche Trockensubstanz per 1000 ccm Reaktionsmischung $K = 0{,}0107$	Umgerechnet in Kat.f.
„Kolloidales Platin"	0,006	1,78
Madinaveitias Hämase	0,000 306	34,97
Senters Hämase	0,004 7	2,28
v. Eulers Fettkatalase	0,001 5	7,13
Batellis Hepatokatalase	0,000 16	66,88
Sörensens Leberkatalase	0,000 34	31,47

Um die Grundlagen und die Reichweite der Gültigkeit einer solchen Beziehung festzustellen, habe ich mit Leberkatalase zunächst die Kinetik der enzymatischen Reaktion studiert.

Bevor ich meine diesbezüglichen Ergebnisse mitteile, sei in Kürze die von mir angewandte Methodik geschildert.

[1]) *Sörensen*, diese Zeitschr. **21**, 284, 1909.
[2]) *Wolff* und *Stöcklin*, C. r. **152**, 729, 1911.
[3]) *v. Euler*, Hofmeisters Beitr. **7**, 1, 1906.
[4]) *v. Euler* und *Josephson*, Chem. Ber. **56**, 1749, 1923.

II. Methodik.

Die Wasserstoffsuperoxydlösungen wurden gewonnen durch Verdünnung von *Mercks* reinstem Perhydrol. Die Reaktionen wurden verfolgt mittels Permanganattitrierung von Proben nach 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten, sofern keine anderen Zahlen angegeben sind. Die Permanganatmethode darf sicher der volumetrischen Bestimmungsmethode überlegen angesehen werden, wenigstens in den Fällen, wo die Aktivität der Enzymlösungen so groß ist, daß die zugesetzte Menge organischer Trockensubstanz zu gering ist, um Permanganat in merkbarem Grade zu verbrauchen. Die Versuchstemperatur war 0° und wurde im Thermostaten mit Eis konstant gehalten. Das Totalvolumen der Proben war stets 50 ccm, wovon 35 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung, etwa 0,02 n 10 ccm Puffer, m/30 Phosphat, $p_H = 6,80$, so daß die Reaktionsmischung m/150 in Beziehung auf das Phosphat war, und Enzymlösung und Wasser bis zu 50 ccm. Die Normalität der Proben an Wasserstoffsuperoxyd war etwa 0,015 n und wechselte innerhalb 20 Proz. Da Wasserstoffsuperoxyd in Lösungen nicht haltbar ist, wurden diese Lösungen täglich gegen etwa 0,005 n $KMnO_4$-Lösung eingestellt, die wiederum gegen Lösungen von *Sörensens* Natriumoxalat gestellt wurden.

Bei der Herstellung von Enzympräparaten wurde die von *Batelli* und *Stern*[1]) benutzte Methode, die nach *Madinaveitia* die stärkste Aktivität verleiht, mit Pferdeleber als Ausgangsmaterial angewandt.

Bei der Extraktion von 1 kg fein gemahlener Pferdeleber mit 1000 ccm destillierten Wassers wurde nach Filtration durch Filtriertuch 350 bis 450 ccm Filtrat gewonnen. Bei Fällung mit der doppelten Menge 96proz. Alkohols bei Gefriertemperatur wurde eine erste Fällung von 35 bis 45 g erhalten. Diese Fällung wurde an der Luft getrocknet und dann im Vakuumexsikkator über Chlorcalcium unter Lichtausschluß verwahrt. Bei Durcheinanderschütteln von 6 g dieses Präparates mit 300 ccm Wasser während 3 Stunden in einer Schüttelmaschine lösen sich 5 bis 10 Proz. auf. Diese Lösungen, welche eine gelbgrüne Farbe besitzen, haben eine Aktivität entsprechend Kat.f. = 30[2]), die 14 Tage bis 3 Wochen vorhält, wenn Toluol ständig vorhanden ist. Manchmal tritt jedoch eine Trübung ein, wobei die Aktivität stark herabgesetzt wird.

Durch Umfällung von 33 g dieses Präparates nach der ersten Alkoholfällung wurde zwar ein Präparat mit Kat.f. = 89,16 erhalten, doch betrug das Gewicht der Fällung nur 1 g. Bei den folgenden Untersuchungen wurden deshalb Lösungen eines durch einmalige Alkoholfällung gereinigten Enzympräparates angewandt.

---

[1]) *Batelli* und *Stern*, Ergebn. d. Physiol. **10**, 544.

[2]) Bei sämtlichen Berechnungen von Kat.f. wurde die Trockensubstanz per 1000 ccm Reaktionsmischung berechnet.

III. Kinetik.

Es ist eine wiederkehrende Erfahrung der Forscher, die sich mit der Kinetik für dieses Enzym mit Präparaten aus verschiedenartigem Material beschäftigt haben, daß bei stärkeren Wasserstoffsuperoxydkonzentrationen und Temperaturen die monomolekularen Konstanten während des Reaktionsverlaufes eine starke Tendenz zu fallen aufweisen.

Senter[1]) schreibt mit Bezug hierauf dem Substrat die Eigenschaft zu, das Enzym durch Oxydation zu inaktivieren. In Lösungen unter m/80 mit Bezug auf H_2O_2 bei 0^0 soll jedoch diese Oxydation aufhören, und in m/300 bis m/1000 Lösungen sei die Reaktionskonstante unabhängig von der Substratkonzentration, so daß also *Eulers* Aktivitätsformel hier ihre Gültigkeit hat.

Waentig und *Steche*[2]) kritisieren scharf die von *Senter* angeführten Bedingungen. Sie können seine Versuche nicht reproduzieren, sondern erhalten fallende Konstanten auch innerhalb der oben angegebenen Grenzen, auch erwies sich die Konstante abhängig von der Substratkonzentration. Weiter machen die Verfasser auf die verschiedenen Resultate aufmerksam, zu denen verschiedene Forscher als unterste Grenze für die Oxydation gekommen sind. *H. v. Euler* erhält eine gute Konstante erster Ordnung bei n/20 H_2O_2 und 0^0, *Senter* bei m/80 H_2O_2 und 0^0, während die Verfasser die Grenze noch niedriger legen müssen. Dieser Umstand kann nur dadurch erklärt werden, daß Enzympräparate verschiedener Herkunft verschiedene Stabilität gegen das Substrat besitzen. Nach Dialyse ergeben Enzymlösungen weniger fallende Konstanten.

Eine vergleichende Untersuchung der Stabilität von verschiedenen Enzympräparaten gegen H_2O_2 ergab, daß dieselbe weniger variierte, als aus der Literatur ersichtlich war. Auf Grund ihrer Erfahrungen modifizieren *Waentig* und *Steche* *Senters* Theorie der H_2O_2-Zersetzung. Anstatt mit *Senter* Enzymzerstörung durch Oxydation anzunehmen, schreiben sie dem Enzym das Vermögen zu, atomaren Sauerstoff zu adsorbieren; hierdurch solle das Wegschaffen der Reaktionsprodukte erschwert und die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt werden.

Als Gründe hierfür geben *Waentig* und *Steche*[3]) folgendes an: „Wenn eine solche (Oxydation) vorläge, sollte man annehmen, daß sie, wie gesagt, nach Maßgabe der jeweiligen Hydroperoxydkonzentrationen erfolgen müssen, d. h. zunächst erheblich wäre und dann

---

[1]) *Senter*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **44**, 157, 1903; **51**, 673, 1905.

[2]) *Waeting* und *Steche*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **78**, 226, 1911; **76**, 177, 1912; **83**, 315, 1913.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **79**, 451, 1912.

schwächer würde, und daß bei mehrmaligem Hydroperoxydzusatz dieses Spiel sich stets wiederholte. Dies ist nicht der Fall, sondern man kann auch bei ein und derselben Fermentlösung alle möglichen Arten des Abfalles beobachten: z. B. sprungweises Abfallen der K-Werte in den ersten Phasen der Reaktion, dann Konstanz, oder auch allmählichen, ziemlich gleichmäßigen Abfall. Bei Versuchen mit mehrmaligem Hydroperoxydzusatz ist sehr häufig ein schließliches Konstantwerden der K-Werte zu beobachten, was nach der Oxydationstheorie ebenfalls nicht erklärlich wäre. Alles dieses kann, wie gesagt, bei ein und derselben Fermentlösung bei verschiedenen Versuchen unter sonst völlig gleichen Reaktionsbedingungen beobachtet werden. Das Auffälligste jedoch ist, daß der eben untersuchte Gang bei gewissen Versuchen überhaupt auch ganz ausbleiben kann.

Dem Anschein nach ist also die Art des Reaktionsverlaufes völlig zufällig. Jedenfalls ist sie durch einen Oxydationsvorgang nicht zu erklären, wenn man nicht annehmen will, daß dieser mit ganz unbestimmbar wechselnder Geschwindigkeit eintritt und manchmal aus ebenso unerklärlichen Gründen überhaupt ausbleibt."

Waentigs und *Steches* Resultate weichen auch in einem anderen Punkte von *Senters* Resultat ab: Die ersteren liefern übereinstimmende Reaktionskoeffizienten bei steigender Temperatur.

Sergius Morgulis[1]) erhielt H_2O_2-Spaltung in so konzentrierten Lösungen, wie z. B. 2,4 Mol/Liter, und sieht deshalb die Vorstellung der vorhergehenden Verfasser von der Enzymzerstörung als übertrieben an.

Eüchi Yamazaki[2]) hat versucht, die Enzymzerstörung in mathematische Formeln zu kleiden, eine Aufgabe, die schwer erscheint, besonders nachdem *Waentig* und *Steche* nachgewiesen haben, daß Enzymlösungen verschiedenen Reinheitsgrades verschiedene Stabilität im Verhältnis zum Substrat haben.

Yamazaki erhält stark fallende Konstanten in sämtlichen Versuchsserien auch bei 0^0 und n/100 Lösungen. Er kommt hierdurch zu dem Resultat, daß die Reaktionsgeschwindigkeit nicht, wie *Senter* und teilweise auch *Waentig* und *Steche* nachweisen, unabhängig von der Substratkonzentration, sondern eine lineare Funktion derselben ist. Hierbei rechnet er nicht mit der Anfangskonzentration, sondern mit dem arithmetischen Mittelprodukt zwischen dieser und der Endkonzentration. Seine Ausrechnung sieht also wie folgt aus (E = Enzymmenge):

$$-\frac{d \ln C}{dt} = KC + \lambda \qquad (1)$$

---

[1]) *Sergius Morgulis*, Journ. of biol. Chem. **47**, 341, 1921.

[2]) *Eüchi Yamazaki*, Sendai Japan 1920.

und ferner

$$\frac{d \ln C}{dt} = K'E, \tag{2}$$

also

$$K'E = KC + \lambda. \tag{3}$$

Differenziert erhält man

$$K' \frac{dE}{dC} = K \tag{4}$$

also

$$\frac{-dE/dt}{-dC/dt} = \frac{K}{K'}. \tag{5}$$

Es scheint, als ob *Yamazaki* in dieser Deduktion einen Beweis dafür sähe, daß die Enzymmenge mit einer konstanten Geschwindigkeit gespalten wird, die proportional der Spaltungsgeschwindigkeit des Substrats ist.

Die Differenzierung der Gleichung (3) kann nur unter dieser Voraussetzung vorgenommen werden. Daß auch die Enzymspaltungsgeschwindigkeit einen Temperaturkoeffizienten aufweist, wäre die Erklärung dafür, daß der Temperaturkoeffizient der Reaktion so klein ist.

Tabelle I.

Versuche betreffend die Kinetik bei 0° und 0,01619 n H_2O_2.

Enzymmenge E	$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$\frac{K}{E}$
1	0,0027	0,0027
2	0,0052	0,0026
4	0,0108	0,0027
8	0,0221	0,0028
12	0,0372	0,0031
16	0,0442	0,0028
20	0,0586	0,0029

Die Primärzahlen sind in Beilage 1 enthalten.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, besteht eine gute Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionskonstante bei Anwendung der Versuchsbedingungen, unter denen die vorliegende Arbeit ausgeführt ist. Ein schwaches Fallen der Konstanten war jedoch unvermeidlich.

Tabelle II bietet einen Vergleich derselben Versuchsverhältnisse bei 20° dar:

Hier liegt somit eine bedeutend kräftigere Abnahme der Konstanten vor. Für jeden einzelnen Zeitraum ist jedoch die Proportionalität gut.

Tabelle II.

Versuche betreffend die Kinetik bei 20° und 0,02n H_2O_2.

Zeit Minuten	Reaktionskonstanten für 1 ccm Enzym K_1	2 ccm Enzym K_2	3 ccm Enzym K_5
2	0,0225	—	—
5	0,0174	0,0351	0,0874
10	0,0164	0,0311	0,0829
15	0,0126	0,0268	—
20	0,0121	—	—
30	0,0107	—	—
60	0,0078	—	—

$\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = 2{,}017$; 5 Min. $\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = 1{,}900$; 10 Min. $\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = 2{,}127$; 15 Min.

$\left(\frac{K_5}{K_1}\right) = 5{,}023$; 5 Min. $\left(\frac{K_5}{K_1}\right) = 5{,}055$; 10 Min.

Daß sich für die Enzymzerstörung so schwankende Angaben vorfinden, dürfte, wie *Waentig* hervorhebt, auf einer variablen Empfindlichkeit des Enzyms beruhen. Wahrscheinlich ist eine Schutzsubstanz vorhanden, mit welcher sich das Enzym auch während der Reaktion verbindet. Der erwähnte Forscher findet in Übereinstimmung mit mehreren anderen, daß Gewebeextrakte aktivieren. Diese Angabe wurde kontrolliert mit einem Autolysesaft von Schweineleber, aber bei Vorhandensein eines Puffers. Hierbei wurde ein negatives Resultat erhalten. Die Abwesenheit eines unorganischen Aktivators könnte auch die Veranlassung zu der oben erwähnten Abnahme der Konstanten gewesen sein. Ich habe Proben untersucht, die mit Bezug auf $MnCl_2$ 0,002172, 0,00008688 und 0,00004344 n, sowie andere, die mit Bezug auf $FeCl_3$ 0,003162, 0,0001265 und 0,00006375 n waren, und zwar mit negativem Resultat in den vier letzten Fällen. Die beiden ersten ergaben Hemmung.

Versuche über Dialyse von Enzymlösungen sprechen auch gegen das Vorkommen eines unorganischen oder eines dialysierbaren organischen Katalysators. *Waentig* und *Steche* erhalten nach Dialyse Reaktionen mit schwächer fallenden Konstanten. Ich selbst habe über die Verhältnisse bei Dialyse einige Versuche angestellt.

Ein Dialyseversuch mit 40 ccm innerer Flüssigkeit (15 ccm — 0,0192 g) $K_{1:50} = 0{,}0089$ und 200 ccm äußerer Flüssigkeit in einem Gefäß mit geschliffenem Stöpsel (letzteres, damit das Toluol nicht entweichen kann) ergab nach 72 Stunden folgendes Resultat: 62,5 Proz. der Trockensubstanz hatte dialysiert, der restliche Teil hatte ein Kat.f., das um 34,8 Proz. dasjenige der Stammlösung überstieg. Parallel mit der Dialyse war jedoch eine Enzyminaktivierung, 60,7 Proz. der ursprünglichen Enzymmenge betragend, eingetreten. Nach Vakuum-

eindunstung auf ein geringeres Volumen ergab es sich, daß die Außenflüssigkeit die Innenflüssigkeit nicht aktivierte. Die Dialysezeit mußte daher verkürzt werden und folglich waren die Dialyseversuche gegen fließendes Wasser vorzunehmen.

Tabelle III.
Dialyseversuche gegen fließendes Wasser.

Zeitdauer der Dialyse Stunden	Reaktionskonstante bei Verdünnung 1:50	Trockengewicht auf 10 ccm Lösung g	Kat.f.	Aktivitätssteigerung
0	$89 \cdot 10^{-4}$	0,0141	15,8	—
2	$98 \cdot 10^{-4}$	0,0066	37,1	—
4	$110 \cdot 10^{-4}$	0,0058	47,4	—
6	$124 \cdot 10^{-4}$	0,0055	56,3	—
8	$111 \cdot 10^{-4}$	0,0050	55,5	—
10	$107 \cdot 10^{-4}$	0,0047	56,9	1:3,6

Außer einer Aufaktivierung auf Grund der Verminderung der Trockensubstanz ist bei den monomolekularen Konstanten eine steigende Tendenz zu merken, als ob ein hemmender Einfluß aufhören würde. Zum Schluß fallen die Konstanten wieder wegen der eintretenden Inaktivierung.

Nach allem zu urteilen, erweisen sich somit die Voraussetzungen für das Zustandekommen einer Aktivitätsformel, die den enzyminaktivierenden Einfluß des Substrats während der Reaktion korrigiert, als klein, da so viele Faktoren hierbei mitspielen. Bei den Inaktivierungsversuchen, die in Tabelle IV zusammengestellt sind, ergab es sich, daß außer der Temperatur, der Zeit und der Normalität H_2O_2 auch die absolute Menge Substrat ausschlaggebend ist, ohne daß jedoch Proportionalität zur Menge verbrauchten Wasserstoffsuperoxyds vorliegt.

Tabelle IV.
Versuche betreffend das enzymzerstörende Vermögen des Substrates. Die Grundlösung (15 ccm = 0,0220 g Trockensubstanz) ergab verdünnt 1:100 K = 0,0108 bei 0° und 0,01619 n H_2O_2.

1 ccm Grundlösung, vorbehandelt mit	Entsprechende Anzahl Mol. H_2O_2	Verdünnung	$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	Aktivitätsverlust Proz.
10 ccm 0,4386 n H_2O_2 .	0,002193	(1:11) (1:10)	0,0086	12,40
20 „ 0,4386 n H_2O_2 .	0,004386	(1:21) (1:5)	0,0048	53,33
5 „ 4,342 n H_2O_2 .	0,01086	(1:6)	0,0145	92,00

Bei größeren Mengen wurden dieselben nicht vollständig gespalten.

Es erübrigt also nur, mit *Senter* bei 0° und genügend verdünnten Lösungen zu arbeiten, wo so gute Konstanten wie nur möglich erhalten werden konnten, und dann mit Hilfe der Formel *Eulers* die Aktivität zu berechnen.

Als Puffer empfehlen *Michaelis* und *Pechstein*[1]) Acetatmischungen n/200, da Salzwirkung bei stärkerer Konzentration oder bei der Anwendung von Phosphat eintritt. Die kräftigste Wirkung erhalten dieselben bei $p_H = 6{,}34$. *Rona* und *Damboviceanu*[2]) erhalten keine Salzwirkung mit m/150 Phosphat. Optimum ist sehr breit von 6,4 bis 8,0. Da H_2O_2 bei alkalischer Reaktion spontan gespalten wird, arbeiten die Verfasser bei $p_H = 6{,}80$.

Diese letztere Vorschrift ist, wie aus vorstehendem ersichtlich, bei der vorliegenden Arbeit befolgt worden.

IV. Reinigung von Katalasepräparaten.

Mittels Fällung und Dialyse ist es geglückt, die Enzymkatalase wesentlich aufzuaktivieren. Besonders die Blutkatalase ist in dieser Richtung eingehend bearbeitet worden. Die letzten Jahre haben jedoch der Enzymchemie ein außerordentliches Mittel zur Reinherstellung von Enzymen zugeführt, nämlich *Willstätters* Sorptionsmethoden, und als Sorptionsmittel steht ja Kaolin und Aluminiumhydrat an erster Stelle.

Sorption mit Kaolin.

Bereits *Madinaveitia* weist in seiner oben angeführten Abhandlung auf das starke Adsorptionsvermögen des Kaolins gegen Katalase hin, wenn auch, wie erwähnt, die Elution damals noch nicht durchgeführt wurde. Mir ist von einer späteren Aufnahme dieser Versuche nichts bekannt. In der Tabelle V ist eine Orientierung über die Verhältnisse bei der erwähnten Adsorption enthalten. Das Kaolin ist vor Gebrauch

Tabelle V.

Adsorptionsversuche mit Kaolin ohne Puffer.

Nr.	Trockensubstanz Enzym g	Kaolin g	Kaolinmenge / Enzymmenge	Die ursprüngliche Aktivität Kat.f.	Volumen ccm	Adsorbierte Aktivität Proz.	Adsorbierte Trockensubstanz
1	0,1547	6,621	49,799	31,52	200	100,00	56,69
2	0,1020	0,9932	9,7370	33,63	115	100,00	35,38
3	0,1167	0,6621	5,6734	32,46	110	88,66	22,66
4	0,0220	0,0662	3,0031	51,23	21	47,10	12,18

mit starker Salzsäure mehrere Stunden gekocht und dann dekantiert worden, bis negative Chlorreaktion erhalten wurde. Das Präparat ist dann unter Wasser aufbewahrt worden. Die Adsorption wurde ohne Puffer ausgeführt, damit die Eindunstungsprobe auf die Restlösungen ausgeführt werden konnte. Die adsorbierte Aktivität ist mit

[1]) *Michaelis* und *Pechstein*, diese Zeitschr. **53**, 320, 1913.

[2]) *Rona* und *Damboviceanu*, ebendaselbst **134**, 2, 1922.

Hilfe der Reaktionskonstanten der Stammlösungen und Restlösungen berechnet worden. Wie ersichtlich, ist also 5 ½mal so viel Kaolin wie Trockensubstanz Enzym erforderlich, um das Enzym bis auf etwa 90 Proz. zu adsorbieren. Dieses Verhältnis variiert jedoch je nach dem Reinheitsgrade des Enzyms.

Mit den beiden ersten Adsorbaten wurde Elution vorgenommen, in dem einen Falle mit Sodalösung, in dem anderen mit Phosphatpuffer, und es zeigte sich auch, daß das Enzym ausgelöst wurde. Die genauen Proportionen sind in der Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle VI.

Versuch betreffend Elution.

Nr.	Gehalt des Adsorbats an Kaolin g	Enzym g	Aktivität des Adsorbats (berechnet auf die Enzymmenge) Kat.f.	Beschaffenheit des Elutionsmittels	p_H
1	6,621	0,0877	55,90	Na_2CO_3-Lösung	10,5
2	0,5934	0,0216	122,05	Phosphat	7,6

Eluierte Menge Trockensubstanz g	Zeit der Dialyse Stunden	Aktivität der Elution Kat.f.	Volumen ccm	Gewonnene Trockensubstanz Proz.	Aktivitätserhöhung g
0,0057	108	508,92	55,2	6,5	16,15
0,0006	84	532,50	40,0	2,8	15,84

Wenn man als Maß der Enzymmengen in den Stammlösungen bzw. in den Elutionslösungen das Produkt Trockensubstanz Enzym × entsprechende Aktivität annimmt, findet man, daß der Gewinn an Enzym im ersteren Falle 59,49 Proz. ist. Im letzteren Falle werden die Berechnungen unsicher, weil die eluierte Menge Trockensubstanz so gering ist.

Adsorption mit Kaolin und Elution veranlassen also eine Steigerung der Aktivität des Enzyms im Verhältnis 1 : 16. Die hierbei erhaltenen Enzympräparate haben somit eine Aktivität, die das beste bis jetzt gefundene Präparat um etwa das Achtfache übertreffen, nämlich *Madinaveitias* Präparat von Hepatokatalase mit Kat.f. = 66,89.

Die erste Adsorption sei hier etwas näher beschrieben, und zwar wurde die Ausgangslösung zu dieser durch 6 g der Alkoholfällung mit etwa 300 ccm Wasser erhalten. Hiervon wurden 100 ccm zur Adsorption genommen. Da man aus 1000 g Leber etwa 40 g Alkoholfällung erhält, ergeben also 50 g Leber 0,1547 g Alkoholfällung mit Kat.f. = 31,52 und nach der Kaolinadsorption und Elution 0,0057 g mit Kat.f. = 508,92.

Das Adsorbat erwies sich als aktiv. Wie aus Tabelle VI hervorgeht, übertrifft dessen Aktivität, gerechnet pro adsorbierte Trockensubstanz,

die Aktivität der Stammlösung um das Zwei- bis Dreifache. Die starke Aktivitätsverbesserung tritt jedoch bei der Elution ein. Daß die Adsorbate aktiv sind, kann darauf beruhen, daß das Enzym sich an dem Kaolin mit einer nicht aktiven Gruppe verbunden hat, und daß diese Bindung keinen Einfluß auf das übrige Reaktionsvermögen des Enzyms hatte. Oder auch ist das Enzym eluiert bei den Reaktionen, bei denen die Aktivität des Adsorbates bestimmt wurde. Als Elutionsmittel könnte hierbei in Frage kommen: Wasser, Substrat oder Puffer. Bei Extraktion einer bestimmten Menge Adsorbat mit bekannter Trockensubstanz und Aktivität mit steigender Menge Wasser erwiesen sich die so erhaltenen Flüssigkeiten nach Zentrifugierung als inaktiv. Auch nicht dadurch, daß man das Adsorbat auf Wasserstoffsuperoxyd reagieren ließ, konnte irgendwelches Enzym ausgelöst werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß das Enzym während der Reaktion selbst eluiert ist, später jedoch in die adsorbierte Form zurückgeht. Dies ist jedoch ein Problem, das sich experimentell schwer angreifen läßt.

Der Puffer eluiert dagegen. Meine Aufgabe war daher, die Stabilität des Adsorbates bei variabler Acidität zu studieren. Zuerst suchte ich die Acidität, bei welcher die Adsorption am stärksten ist.

Tabelle VII.

Acidität und Adsorption.

10 ccm Enzymlösung (Trockengewicht 0,0110 g), 10 ccm Puffer (Acetatmischung). ½ ccm Kaolin = 0,0331 g.

p_H x	Adsorbierte Aktivität y Proz.	p_H x	Adsorbierte Aktivität y Proz.
3,0	47,6	5,0	82,6
4,0	70,8	6,0	0,0

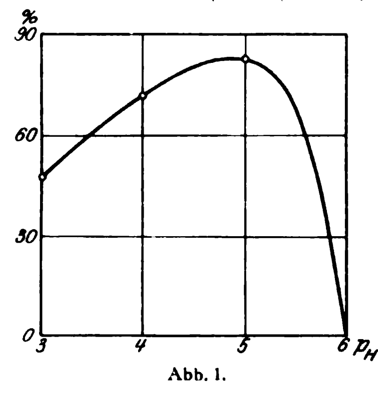


Abb. 1.

Tabelle VII enthält eine Reihe Adsorptionen mit konstantem Verhältnis zwischen Enzymmenge und Kaolinmenge, aber mit variierender Acidität bei Anwesenheit von Acetatpuffern.

Abb. 1 verdeutlicht in graphischer Weise die Verhältnisse. Die Adsorption erreichte also ihr Maximum bei $p_H = 5$.

Eine ähnliche Untersuchung der Elution mit einer bekannten Menge Adsorbat und Phosphatpuffer mit verschiedener Acidität ergab, daß bei p_H über 7,6 volle Elution eingetreten war (s. Tabelle VIII).

Tabelle VIII. Acidität und Elution.
1 ccm Sorbat = 0,0121 g (Kaolin + Enzym),
10 ccm Phosphatpuffer.

p_H *x*	Eluierte Aktivität *y* Proz.	p_H *x*	Eluierte Aktivität *y* Proz.
5,09	2,49	6,80	93,24
5,99	32,55	7,60	100,00

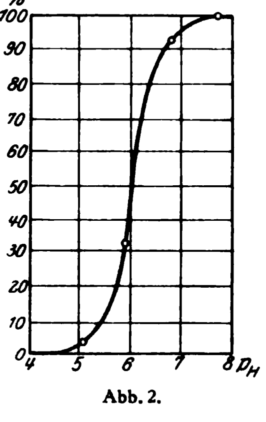


Abb. 2.

Abb. 2 gibt ein übersichtliches Bild.

Das Gleichgewicht zwischen Enzym und Kaolin einerseits und Adsorbat andererseits braucht jedoch nicht allein eine Funktion der Acidität zu sein. Es hat sich erwiesen, daß der Puffer in gewissen Fällen eine spezifische Wirkung besitzt.

Wie aus diesen Versuchen hervorgehen dürfte, liegen somit die Verhältnisse für die Reinherstellung von Katalasen mit Hilfe von Kaolinsorption besonders günstig.

Sorption mit $Al(OH)_3$-Suspension.

$Al(OH)_3$-Suspension weist ein noch mehr hervortretendes Adsorptionsvermögen für das Enzym auf. Tabelle IX enthält eine erste Orientierung über die Verhältnisse.

Tabelle IX.
Adsorptionsversuch mit $Al(OH)_3$-Suspension ohne Puffer.

Nr.	Trockengewicht Enzym g	Trockengewicht $Al(OH)_3$ g	$\frac{g\ Al(OH)_3}{g\ Enzym}$	Volumen ccm	Adsorbierte Aktivität Proz.
1	0,0284	0,0026	0,0916	20,5	9,3
2	0,0284	0,0052	0,1831	21,0	45,5
3	0,0284	0,0502	1,7676	25,0	99,6

Die $Al(OH)_3$-Suspension ist nach *Willstätters* Vorschrift[1]) bereitet worden. Um also etwa 90 Proz. des Enzyms zu adsorbieren, ist nur das $1\frac{1}{2}$fache an Trockensubstanzsuspension von Trockensubstanz Enzym erforderlich. Und doch scheinen diese ersten Versuche nicht mit einer geeigneten Acidität ausgeführt zu sein. Bei späteren Versuchen hat es sich nämlich gezeigt, daß die gleiche Adsorption mit bedeutend geringeren Mengen Aluminiumhydrat erreicht werden kann. Die erforderliche Proportion für Adsorption zwischen 90 bis 100 Proz. der Aktivität beruht sicher nicht allein auf der Acidität, sondern auch auf dem Grade der Dispersität der Enzymlösung.

[1]) *Willstätter* und *Racke*, Liebigs Ann. 125.

Bei einer Serie von Adsorptionen für die Bestimmung des Aciditätsoptimums für dieselben wurde nur etwas mehr als ein Drittel Trockensubstanz $Al(OH)_3$ im Verhältnis zu Trockensubstanz Enzym angewendet, und doch wurde bei $p_H = 5{,}79$ Adsorption von 86,31 Proz. erhalten. Die näheren Verhältnisse hierbei waren folgende: 20 ccm Enzymlösung wurden zu jeder Probe genommen, entsprechend einer Trockensubstanz von 0,0464 g. Hierauf wurde die Acidität mit Hilfe von Essigsäure bzw. Natronlauge und etwas Natriumacetat eingestellt, worauf mit 3 ccm Suspension = 0,0167 g Trockensubstanz $Al(OH)_3$ adsorbiert wurde. Die Stammlösung ergab verdünnt 1 : 100 $K = 0{,}0240$ und besaß somit eine Aktivität, entsprechend Kat.f. = 51,73. Die Acidität ist stets auf elektrometrischem Wege in den Versuchslösungen bestimmt worden. Das Resultat dieser Untersuchung geht aus Tabelle X sowie aus Abb. 3 hervor.

Tabelle X.

Acidität und Adsorption mit $Al(OH)_3$.

p_H	Adsorbierte Aktivität Proz.	p_H	Adsorbierte Aktivität Proz.
3,57	9,9	4,96	78,7
4,32	48,4	5,79	86,3
4,86	74,6	7,10	82,9

Das Optimum ist somit besonders breit und befindet sich ungefähr bei $p_H = 6$. Die Aluminiumsuspension wies bei variierender Acidität wechselnde Dispersität auf. Bei p_H unter 5 sedimentierte sie ziemlich rasch, während sie sich nach der alkalischen Seite zu mehr kolloidal verhielt. Es ist möglich, daß dieser Umstand auf den Grad der Adsorption einwirken kann.

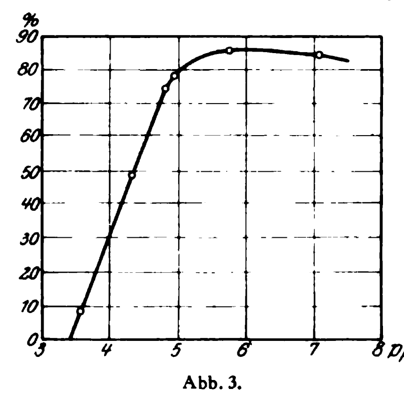


Abb. 3.

Um ein Adsorbat zu erhalten, mit welchem die Elution später studiert werden könnte, wurden 120 ccm einer Enzymlösung, Trockengewicht = 0,1600 g $K_{1:25} = 0{,}0147$, also Kat.f. = 13,78 mit 6 ccm $Al(OH)_3$-Suspension = 0,0323 g Trockengewicht adsorbiert. Hierbei wurden 89,11 Proz. der Aktivität und 19,69 Proz. der Trockensubstanz adsorbiert. Die Enzymlösung war stark kolloidal, woraus sich die starke Adsorption erklärt.

Das Adsorbat, das wie sämtliche anderen unter Wasser aufbewahrt wurde, enthielt nach der Abzentrifugierung auf 5 ccm 0,0070 g Trocken-

gewicht und ergab verdünnt 1 : 50 $K = 0{,}0185$. Somit ist Kat.f., berechnet auf die adsorbierte Trockensubstanz = 67,02. Das Adsorptionsverfahren hat somit zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms 1 : 4,86mal geführt, eine Zahl, die man aus der oben angegebenen Prozentzahl adsorbierte Aktivität bzw. Trockensubstanz erwarten konnte.

1 ccm von diesem Adsorbat wurde mit 10 ccm m/30 Phosphatpuffer von verschiedener Acidität extrahiert, wobei sich die Verhältnisse wie folgt gestalteten:

Tabelle XI.

Acidität und Elution von $Al(OH)_3$-Adsorbat.

p_H	Eluierte Aktivität Proz.	p_H	Eluierte Aktivität Proz.
5,71	7,0	6,42	36,9
6,22	18,4	7,38	76,0

Von $p_H = 8$ aufwärts an tritt somit so gut wie vollständige Elution ein.

Aktivitätssteigerung durch $Al(OH)_3$-Sorption.

Bei diesem sehr großen Adsorptionsvermögen der $Al(OH)_3$-Suspensionen lag es nahe, zu vermuten, daß mit Hilfe dieses Sorptionsmittels eine stark gesteigerte Aktivität zu erreichen wäre. Dies hat sich jedoch nicht bestätigt. Die Adsorption kann zwar mit sehr kleinen Mengen Suspension vorgenommen werden, doch scheint die Trockensubstanz im übrigen ebenfalls leicht zu adsorbieren, und ohne größere Schwierigkeit eluiert letzteres im Gegensatz zu dem Verhalten des Kaolinsorbats, so daß das Ganze bei den Versuchen, die hier beschrieben werden, zu einer vier- bis fünffachen Aktivitätssteigerung geführt hat.

75 ccm Enzymlösung = 0,0760 g Trockengewicht $K_{1:50} = 0{,}0043$ Kat.f. = 10,61 wurden mit 4 ccm $Al(OH)_3$-Suspension Trockengewicht = 0,0223 g adsorbiert. Nach Elution mit 1 proz. sekundärem Natriumphosphat betrug das Volumen der Lösung 27 ccm und ergab verdünnt 1 : 50 $K = 0{,}0071$. Nach 45 Stunden Dialyse im Kollodiumsack gegen destilliertes Wasser ergab die Lösung, verdünnt 1 : 50, $K = 0{,}0031$. 15 ccm ergaben ein Trockengewicht von 0,0027 g. Die Endlösung hat somit ein Kat.f. von 43,05. Das Resultat ist eine Aktivitätserhöhung 1 : 4,06. Ausbeute an Enzym beträgt, berechnet nach oben angegebenen Grundsätzen, 25,95 Proz. Die Elutionslösung ist jedoch während der Dialyse um 56,34 Proz. inaktiviert worden.

400 ccm Enzymlösung = 0,8373 g $K_{1:50} = 0{,}0157$, Kat.f. also = 18,75, wurden mit 20 ccm Suspension = 0,1116 g Trockengewicht adsorbiert. Nach der Elution mit sekundärem Natriumphosphat betrug das Volumen 98 ccm, und die Lösung ergab da $K_{1:50} = 0{,}0179$. Nach

17 Stunden ergab die Dialyse nur $K_{1:50} = 0,0138$. Mit 20 ccm wurde die Dialyse noch 25 Stunden fortgesetzt. Die so erhaltene Lösung ergab $K_{1:50} = 0,0099$, und 15 ccm davon ergaben 0,0047 g Trockensubstanz. Diese Lösung hat also ein Kat.f. von 78,98. Die Aktivitätserhöhung beläuft sich auf 1 : 4,21. Die Ausbeute an Enzym betrug nur 15,45 Proz., was jedoch darauf beruhen dürfte, daß eine recht kleine Menge Suspension zur Verwendung gekommen ist.

75 ccm der Elution nach der ersten $Al(OH)_3$-Adsorption wurden einer neuen Adsorption und Elution unterworfen, nachdem die Dialsye 17 Stunden gedauert hatte. Diese Lösung ergab zu diesem Zeitpunkte $K_{1:50} = 0,0138$, und nach weiteren 25 Stunden Dialyse erwies es sich, daß 15 ccm 0,0047 g Trockensubstanz enthielten. Kat.f. ist also 110,1. Nach Sauermachen mit etwas Essigsäure wurde aufs neue mit 4 ccm $Al(OH)_3$-Suspension, Trockengewicht 0,0223 g adsorbiert.

Nach der Elution betrug das Volumen 23 ccm, und die Lösung ergab hierbei $K_{1:100} = 0,0172$. Nachdem die Lösung 45 Stunden lang dialysiert worden war, hielt sie auf 15 ccm 0,0019 g und ergab 1 : 100 $K = 0,0132$. Kat.f. ist also 521,1. Die Aktivitätserhöhung bei dieser letzten Adsorption beträgt 1 : 4,73 und die Ausbeute an Enzym 58,67 Proz. infolge der relativ großen zur Anwendung gelangten Menge Suspension.

Durch doppelte $Al(OH)_3$-Adsorption ist somit eine Erhöhung von Kat.f. im Verhältnis 1 : 27,8 erreicht worden.

Aus diesen Versuchen ergeben sich somit Ausgangspunkte für eine weitere erfolgreiche Reinigung des Enzyms Katalase, die in diesem Laboratorium verfolgt werden soll. Dies ist natürlich mit großen Präparatverlusten verbunden, zu welchen die starke Inaktivierung des Enzyms bei Dialyse am meisten beizutragen scheint.

V. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten der Verbindung Enzym — Substrat.

Die Annahme, daß die enzymatischen Reaktionen durch die Verbindung zwischen Enzym und Substrat vermittelt werden (*Brown* u. a.), und die Einführung von Gleichgewichtskonstanten dieser Verbindung (*Michaelis*) hat sich auf dem Gebiete der enzymatischen Kinetik als sehr fruchtbar erwiesen. Auch für Katalase scheint sich die erwähnte theoretische Auffassung zur Anwendung bringen zu lassen.

Eine solche Beobachtung wie die, daß nach einer Reaktion ein Zusatz von neuem Substrat die Reaktion von neuem in Gang setzt, auch wenn die erste Reaktion nicht zu Ende verlaufen ist, läßt sich durch die oben genannte Auffassung erklären.

Die oben diskutierte Enzymzerstörung kompliziert die Sache jedoch wesentlich. Nach einer Reihe von Versuchen mehr orientierenden Charakters glückte jedoch eine Versuchsreihe, bei welcher mit einer konstanten Enzymmenge (1 ccm = 0,000859 g Trockensubstanz) durch

Verstärkung der Substratkonzentration das Maximum der Wirkung erreicht und überschritten werden konnte, während gleichzeitig die Wirkung in den sehr verdünnten Lösungen das Maximum um mehr als 50 Proz. unterstieg. In diesem Gebiete ist also die Reaktionsgeschwindigkeit eine Funktion der Substratkonzentrationen, wie aus den Primärzahlen in Beilage 2 hervorgeht. Da die Reaktionskonstanten sehr wesentlich abnehmen, ist das Produkt der ersten Konstante in jeder Serie mit der Normalität der Probe als Maß für die Konzentration der aktiven Verbindung betrachtet worden[1]).

Tabelle XII ist eine Zusammenstellung der Resultate.

Tabelle XII. Versuch betreffend die Einwirkung der Substratkonzentration auf die Reaktion.

Die Primärzahlen finden sich in Beilage 2 wieder.

Normalität n	$x = -\log n$	$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ für 2 Minuten	$K_{2\,Min.} \cdot n$	$\frac{K_{2\,Min.} \cdot n}{0{,}035729} = y$
0,443 5	0,353 11	0,068	0,030 158	0,844 07
0,380 2	0,419 99	0,090	0,034 218	0,957 71
0,316 8	0,499 21	0,111	0,035 165	0,984 21
0,253 4	0,596 19	0,141	0,035 729	1,000 00
0,190 1	0,721 25	0,160	0,030 416	0,851 30
0,126 7	0,897 22	0,187	0,023 693	0,663 13
0,063 35	1,198 25	0,220	0,013 937	0,390 08

Konstruiert man auf Grund dieser Zahlen nach *Michaelis* die Dissoziationsrestkurve für die Verbindung mit den Logarithmen für

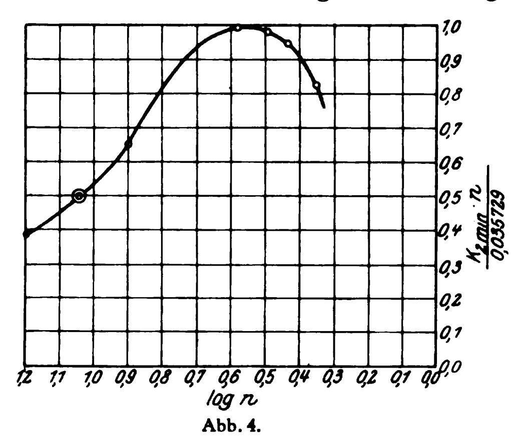


Abb. 4.

die Substratkonzentration und dem Maße des Dissoziationsrestes mit dem höchsten als Einheit, so erhält man die Kurve in Abb. 4.

[1]) Vergleiche hierzu die Verhältnisse bei der Saccharase; *Euler* und *Myrbäck*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **125**.

Bezeichnet man die Dissoziationskonstante mit D, so erhält man, da die Abszissen aus Logarithmen für die Normalitäten anstatt für die Molekülkonzentrationen bestehen, für

$$Y = \frac{1}{2} \log 2D = 0{,}96 - 2,$$

also $D = 0{,}0456$, da $K_M = \frac{1}{D}$; also $K_M = 21{,}9$ oder rund 22.

Dieser Wert ist wahrscheinlich etwas zu niedrig, da die Enzymzerstörung den oberen Teil der Dissoziationsrestkurve zerstört. Die Größenordnung ist dieselbe wie für andere Enzyme (vgl. die Zusammenstellung bei *v. Euler* und *Josephson*, Chem. Ber. 56, 1749, 1923).

VI. Die Thermostabilität des Enzyms.

Eine immer wiederkehrende Angabe in der Literatur ist, daß konzentriertere Lösungen von Katalasen bedeutend haltbarer sind als verdünnte, ohne daß jedoch irgendwelche quantitative Angaben gemacht worden sind. Dies war auch bei höheren Temperaturen ganz richtig der Fall. Wie aus untenstehenden Zahlen hervorgeht, ist die Thermostabilität in hohem Grade von der Konzentration abhängig, eine exakte Bestimmung ist darum nicht möglich.

Eine Enzymlösung, enthaltend 0,01219 g auf 15 ccm, wurde mit anwesendem Puffer bei optimal p_H 60 Minuten lang auf 60° in verschieden verdünnten Lösungen erhitzt. Die Resultate waren folgende:

Verdünnung	Übrigbleibende Aktivität in Proz.
1:2	68,7
1:10	46,5
1:25	24,3

Es liegt die Annahme nahe, daß das Enzym eine Vereinigung mit einer Schutzsubstanz bildet, welche bei Verdünnungen dissoziiert. Besitzt hierbei das freie Enzym eine geringere Thermostabilität als das gebundene, so wird das oben erwähnte Verhalten erklärlich. Zusatz von inaktivierter Enzymlösung dürfte stabilisierend auf die verdünnten Enzymlösungen wirken. Dies konnte tatsächlich konstatiert werden. Bei Inaktivierung der Stammlösung selbst bei 70° koagulierte der Hauptteil der Trockensubstanz, so daß mit dieser Lösung ein sehr schwacher Effekt erzielt wurde. Durch Wasserextraktion von Schweineleber, welche eine längere Zeit mit Toluol autolysiert worden war, wurde eine starke Lösung erhalten, die nach Inaktivierung bei 90° noch 0,1549 g auf 5 ccm enthielt. Zwei Meßkolben von je 25 ccm wurden gefüllt, der eine mit 2 ccm Enzym, 10 ccm m/30 Phosphatmischung ($p_H = 6{,}80$), der Rest Wasser, der andere mit 2 ccm Enzym,

10 ccm Phosphatmischung, 10 ccm Autolysesaft, der Rest Wasser. Nach Verlauf einer Stunde bei 60° hatte die erstere Lösung noch 46,02 Proz. der ursprünglichen Aktivität, die letztere 86,5 Proz.

Das Studium der Abhängigkeit der Inaktivierung von der Zeit läßt das Feld offen für die Annahme von Modifikationen von verschiedener Stabilität, vorausgesetzt, daß die Inaktivierung jeder einzelnen eine absolut monomolekulare Reaktion ist[1]). Tabelle XIII zeigt den Verlauf der Inaktivierung einer Enzymlösung bei 60°. Die berechneten Werte sind unter der Annahme von zwei Modifikationen erhalten worden, von denen die stabilere bis auf 57,15 Proz. geht.

Tabelle XIII.

Die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Zeit bei Erhitzung. Versuchstemperatur 60°.

Erhitzungsdauer Minuten	Gefundene Reaktionskonstante $k.10^4$	Berechnete Reaktionskonstante $k.10^4$	Erhitzungsdauer Minuten	Gefundene Reaktionskonstante $k.10^4$	Berechnete Reaktionskonstante $k.10^4$
0	91	—	45	41	42
10	60	61	60	39	39
20	51	51	120	29	30
30	45	45	180	24	23

$K_c = \frac{1}{t} \log \frac{K_a}{K_t}$ beträgt 0,0534 resp. 0,0020.

Zusammenfassung.

1. In der vorliegenden Arbeit ist ein wesentlicher Fortschritt hinsichtlich des Reinheitsgrades der Leberkatalase erzielt worden.

Die Wirksamkeit wird angegeben durch

$$\text{Kat.f.} = \frac{\text{Reaktionskonstante}}{\text{Trockenrückstand in 1000 ccm Reaktionsmischung}}.$$

Wie auf S. 295, Tabelle VI, beschrieben und dargestellt, ist nach Kaolinadsorption und Elution Kat.f. = 532, und nach zweimaliger Adsorption mit $Al(OH)_3$, wie auf S. 297 beschrieben, Kat.f. = 521,1, während von *Madinaveitia* mit Leberkatalasen 66,88 und mit Blutkatalasen 34,97 erreicht worden war.

2. Eine Bestimmung der Affinitätskonstante für die Verbindung Enzym-Substrat ergab den Wert

$$K_M = 22.$$

Die Größenordnung ist also dieselbe wie diejenige anderer daraufhin untersuchter Enzyme.

[1]) Vgl. *H. von Euler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **102**, 130, 1923.

Beilage 1.

Kinetische Untersuchung bei 0° mit 0,01619 n.H_2O_2. Phosphatpuffer m/150 der Reaktionsmischung: p_H = 6,80. Totalvolumen: 50 ccm, wovon jedesmal 5 ccm zu den Proben entnommen wurden. Enzymlösung (15 ccm = 0,0220 g), verdünnt auf 1 : 100, Kat.f. = 36,83.

Zeit Minuten	$KMnO_4$ ccm	*K*
	¼ ccm Enzym.	
0	14,21	—
5	13,72	0,0031
10	13,20	0,0032
15	13,00	0,0026
20	12,70	0,0024
25	12,40	0,0023
	Mittel . .	0,0027

Zeit Minuten	$KMnO_4$ ccm	*K*
	½ ccm Enzym.	
0	14,21	—
5	13,40	0,0051
10	12,50	0,0056
15	11,75	0,0055
20	11,30	0,0050
25	10,70	0,0049
	Mittel . .	0,0052

Zeit Minuten	$KMnO_4$ ccm	*K*
	1 ccm Enzym.	
0	14,21	—
5	12,40	0,0118
10	10,90	0,0115
15	9,72	0,0103
20	8,75	0,0105
25	8,00	0,0100
	Mittel . .	0,0108

Zeit Minuten	$KMnO_4$ ccm	*K*
	2 ccm Enzym.	
0	14,21	—
5	10,60	0,0255
10	8,30	0,0233
15	6,60	0,0222
20	5,70	0,0198
25	4,60	0,0196
	Mittel . .	0,0221

Zeit Minuten	$KMnO_4$ ccm	*K*
	3 ccm Enzym.	
0	14,21	—
5	8,80	0,0416
10	6,05	0,0371
15	4,30	0,0356
20	3,10	0,0331
25	2,40	0,0386
	Mittel . .	0,0372

Zeit Minuten	$KMnO_4$ ccm	*K*
	4 ccm Enzym.	
0	14,21	—
5	8,05	0,0494
10	4,90	0,0462
15	3,10	0,0441
20	2,05	0,0420
25	1,50	0,0391
	Mittel . .	0,0442

Zeit Minuten	$KMnO_4$ ccm	*K*
	5 ccm Enzym.	
0	14,21	—
5	6,52	0,0677
10	3,52	0,0606
15	2,05	0,0561
20	1,20	0,0537
25	0,60	0,0550
	Mittel . .	0,0586

Beilage 2.

Versuche betreffend die Einwirkung der Substratkonzentration auf die Reaktion. Versuchstemperatur: 0°. Puffer: m/150. Phosphat: $p_H = 6,80$. Totalvolumen 50 ccm, wovon zu jeder Probe 5 ccm entnommen wurden. Enzymlösung: 1 ccm zu jeder Probe (Trockengewicht: 0,00086 g).

Zeit Minuten	KMnO₄ ccm	K	Parallelprobe KMnO₄ ccm	Parallelprobe K
		0,4435 n H_2O_2		
0	11,90	—	—	—
2	8,70	0,068	8,79	0,066
4	8,11	0,042	8,11	0,042
6	7,99	0,029	7,90	0,030
8	7,70	0,023	7,65	0,024
10	7,40	0,021	7,35	0,021
		0,3802 n H_2O_2		
0	10,20	—	—	—
2	6,75	0,090	6,75	0,090
4	6,05	0,057	6,00	0,058
6	6,00	0,038	5,95	0,039
8	5,95	0,029	5,90	0,030
10	5,70	0,025	5,80	0,025
		0,3168 n H_2O_2		
0	8,50	—	—	—
2	5,10	0,111	5,00	0,115
4	4,35	0,073	4,20	0,077
6	3,97	0,055	3,85	0,057
8	3,75	0,044	3,50	0,048
10	3,50	0,039	3,40	0,040
		0,2534 n H_2O_2		
0	21,28	—	—	—
2	11,10	0,141	11,30	0,137
4	8,10	0,105	8,50	0,100
6	6,60	0,085	7,00	0,080
8	5,70	0,072	5,30	0,075
10	4,95	0,063	4,95	0,063
		0,1901 n H_2O_2		
0	15,96	—	—	—
2	7,65	0,160	7,50	0,164
4	5,03	0,125	4,86	0,129
6	3,52	0,109	3,25	0,115
8	2,55	0,100	2,35	0,104
10	1,95	0,091	1,72	0,091
		0,1267 n H_2O_2		
0	10,64	—	—	—
2	4,50	0,187	4,50	0,187
4	2,35	0,164	2,25	0,169
6	1,35	0,149	1,20	0,158
8	0,80	0,140	0,75	0,144
10	0,45	0,137	0,41	0,142
		0,06335 n H_2O_2		
0	58,45	—	—	—
2	21,25	0,220	21,00	0,222
4	8,50	0,209	8,90	0,204
6	3,70	0,200	4,00	0,194
8	1,70	0,192	2,00	0,183
10	0,90	0,181	1,00	0,167

Wasserkulturen mit Benzoesäurezusatz.

Assimilierung der Benzoesäure durch Kulturpflanzen.

Von

Th. Bokorny, München.

(Eingegangen am 27. Dezember 1923.)

*Gersten*keimlinge wurden zuerst in der Keimschale aufgezogen bis zum Gewicht von etwa 0,5 g pro (oberflächlich abgetrocknete) Keimpflanze. Dann wurden sie auf *Wasserkulturgläser* (je einer pro Glas und 750 ccm Nährlösung) gesetzt, und zwar in folgende Lösungen:

a) Kontrollversuch. Brunnenwasser mit 0,0005 Proz. Monokaliumphosphat + 0,0002 Proz. Magnesiumsulfat + 0,005 Proz. Harnstoff.

b) Ebenso wie a), dazu noch 0,016 Proz. Benzoesäure.

c) Ebenso wie a), dazu noch 0,0066 Proz. Benzoesäure.

Alle Kulturgläser wurden mit schwarzen Papphülsen umgeben.

Nach 3 Monaten (27. März bis 24. Juni) wurden die Kulturen, die zuerst an einem gut beleuchteten Fenster des Laboratoriums, dann (von Mitte Mai an) im Freien auf einer kleinen Altane vor einem anderen Fenster des Laboratoriums gestanden hatten, untersucht:

a) Die Keimpflanze des Kontrollversuches war am wenigsten gewachsen; ihr Gewicht betrug nach dem oberflächlichen Abtrocknen nur 0,15 g; die verbrauchte Nährlösung war nur 50 ccm. Am Boden der Flasche befand sich ein starker Algenbelag von grüner Farbe. Da die Nährlösung normale Zusammensetzung hatte, muß der Grund für das Mißlingen des Kontrollversuches in der Keimpflanze selbst gesucht werden; sie war offenbar von Haus aus wenig existenzfähig.

b) Diese Pflanze war gut gewachsen; ihre oberirdischen Teile hatten eine Länge von nahezu 50 cm; die Wurzel war reich verzweigt. Das Kulturwasser war frei von Pilzen und Algen. Das Gewicht der stark bewurzelten lufttrockenen Pflanze betrug 2,61 g, das Frischgewicht 12,80 g. Von der Lösung waren 360 ccm verbraucht worden.

c) Hier war recht mäßiges Wachstum zu konstatieren. Die oberirdischen Teile waren nur 15 cm hoch geworden, die Wurzel wies geringere Verzweigung und Gesamtentwicklung auf als die der Versuchs-

pflanze b). Die verbrauchte Lösung betrug 205 ccm. Am Boden der sonst klaren Lösung befand sich eine grüne Algenvegetation. Das Gewicht der abgetrockneten Pflanze betrug 0,90 g.

Das Verhalten der Gerstenpflanze in *Versuch b)* schien mir Schlüsse über die Verwendung oder Nichtverwendung der Benzoesäure im Pflanzenkörper zuzulassen. Es waren 360 von 750 ccm Lösung durch die Pflanze aufgesaugt worden. Da die Benzoesäure 0,016 Proz. betrug, mußten 360 × 0,00016 g, das sind 0,0576 g Benzoesäure in die Pflanze eingetreten sein, wenn die Lösung unverändert aufgenommen wurde. Der Rückstand (die Trockensubstanz) in den übriggebliebenen 390 ccm Lösung betrug, wie ich feststellte, nur mehr 0,030 g, während ursprünglich in der ganzen Lösung insgesamt 750 × 0,0217, das sind 0,16275 g Trockensubstanz, vorhanden waren, darunter 0,120 g Benzoesäure. Es waren mehr Gewichtsteile Lösungstrockensubstanz in die Pflanze übergegangen, als sich aus den 360 ccm aufgesaugter Lösung errechnet, nämlich statt 0,07812 g 0,13275 g. Von den ursprünglich vorhandenen 0,120 g Benzoesäure mußten mehr als 0,120—0,030, das sind 0,090 g, in die Pflanze übergetreten sein. Da der Gehalt des Rückstandes (aus der Lösung) an Benzoesäure nicht bestimmt wurde, nehme ich den ungünstigsten Fall an, daß der ganze Lösungsrückstand aus Benzoesäure bestand, was natürlich nicht der Fall war. Dann sind 0,120 — 0,030 = 0,090 g Benzoesäure in die Pflanze übergegangen — und haben dieselbe nicht getötet!

Da das Frischgewicht der Versuchspflanze bei Abschluß des Versuchs 12,8 g betrug, so müßte die Benzoesäure, wenn sie nicht verbraucht worden wäre, in der Konzentration von fast 1 Proz. innerhalb der Pflanze vorhanden gewesen sein, eine Menge, durch die jede Pflanze in kürzester Zeit getötet wird. Denn die Benzoesäure ist giftig! Nach *R. Koch* hindert die Benzoesäure schon in der Verdünnung 1 : 2867 die Entwicklung von Bazillen (Milzbrand). Wegen der entwicklungshemmenden Wirkung gegen Bakterien wird die Benzoesäure als Frischerhaltungsmittel für Fleisch benutzt. Schon 0,08 Proz. Benzoesäure verhindern die Keimung von Pflanzensamen, z. B. Klee, Rotkohl, Lein, Weizen. Hefe wächst in einer guten Nährlösung erst dann, wenn die zugesetzte Benzoesäure nicht mehr als 0,05 Proz. beträgt.

Es muß also die Benzoesäure in der Pflanze (Gerste) — entgegen meiner früheren Annahme — eine Verwendung, vermutlich als Nährstoff, finden, wenn sie in großer Verdünnung in dieselbe gelangt. Frühere Versuche[1]) haben ja ergeben, daß die Benzoesäure von manchen Bakterien und Schimmelpilzen schon von 0,2 Proz. an als C-Nahrung gebraucht werden kann; sie wachsen in einer Nährlösung, die keine

---

[1]) Diese Zeitschr. **132**, Heft 1/3.

andere C-Quelle als Benzoesäure enthält. Es liegt also nahe, auch für die Gerstenpflanze ein Assimilationsvermögen gegen Benzoesäure anzunehmen.

Um dieses Resultat sicherzustellen, wurde der Versuch b) noch mehrmals wiederholt, immer mit dem gleichen Resultat, mit wenigen Ausnahmen, wo offenbar der Gerstenkeimling durch eine in ihm selbst liegende Ursache zugrunde ging. Solche Fehlschläge kommen ja bei allen Ernährungsversuchen mit Wasserkulturen vor.

Die Untersuchung der Gerstenpflanzen in den Versuchen b) auf Anwesenheit von Benzoesäure nach dreimonatiger Ernährung lieferte ein negatives Resultat. Auch hieraus ergibt sich, daß die Benzoesäure in geeigneter hoher Verdünnung von der Gerstenpflanze und vermutlich auch von anderen Blütenpflanzen assimiliert wird, oder auch durch den Verbrauchs-(Atmungs-)Prozeß zerstört wird.

Das ändert natürlich nichts an der vom Verfasser früher (diese Zeitschrift 1922) ausgesprochenen Meinung, daß die Hippursäure, welche in den Stoffwechsel der Pflanze gebracht, Benzoesäure (neben Glykokoll) bildet, eine leicht schädlich wirkende Stickstoffquelle für die grüne Pflanze darstellt. Denn die Hippursäure liefert bei der Spaltung über zwei Drittel ihres Gewichtes Benzoesäure; wie früher nachgewiesen (*B.*, a. a. O.) wurde, wirken schon 0,08 Proz. Benzoesäure tödlich auf Keimpflanzen ein, 0,05 Proz. verzögern die Keimung von Klee, Rotkohl, Lein. Also muß 0,12 proz. Hippursäure die Pflanzen abtöten, 0,072 proz. ihre Entwicklung hemmen. Für die Düngung mit tierischem Harn ist das von Belang, es muß für entsprechende Verdünnung gesorgt werden.

Physiologisch oder biochemisch dürfte die Tatsache der Benzoesäureverwendung in der grünen Pflanze nicht ohne Interesse sein, galten doch Benzolderivate selbst für Pilze als nur ausnahmsweise und schwierig assimilierbar.

Luftverdünnung und Blutregeneration durch „Hämopoietine“.

Von

J. Förster in Budapest.

(Aus dem Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1923.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Seitdem *Paul Bert* festgestellt hat, daß das Höhenklima auf das Blutbild einen Einfluß hat, finden wir zahlreiche Arbeiten in der Literatur, die sich mit dieser Tatsache beschäftigen. Heute besteht allgemein die Ansicht, daß im Höhenklima vermehrte Blutbildung stattfindet, denn es ist vielfach festgestellt worden, daß die im Höhenklima zu findende Hyperglobulie und die Hyperhämoglobinämie nicht scheinbar sind, sondern in Wirklichkeit bestehen.

Der Mechanismus dieser Blutbildung ist aber noch heute fraglich; wir wissen nicht, ob wir es da mit einer beschleunigten Blutbildung oder mit einer beschleunigten Ausschwemmung von Blutzellen aus dem Knochenmark zu tun haben.

Im Jahre 1906 fanden *Carnot* und *Deflandre*[1]), daß das Serum von anämischen Tieren blutbildende Wirkung habe, und nahmen an, daß dieses Serum, das wir seither als *Carnot*sches Serum bezeichnen, Substanzen enthält, die sie als „*Hämopoietine*“ bezeichneten. Diese Untersuchungen wurden von *Müller*[2]) und anderen, zuletzt von *Giribaldi*[3]) wiederholt und bestätigt. *Müller* hatte die Untersuchungen sodann erweitert und fand unter anderem, daß das Serum von Tieren, welche sich längere Zeit im luftverdünnten Raume befanden, ähnlich hämopoietisch wirkt. Er hatte Meerschweinchen 18 bzw. 33½ Stunden einem Luftdruck von 460 mm Hg ausgesetzt und ihnen nachher mittels Herzpunktion Blut entnommen. Das Serum dieses Blutes hatte er Mäusen intraperitoneal injiziert. Er fand, daß die Blutkörperchenzahl am zweiten Tage nach der Einspritzung eine Zunahme im Mittel von 14 Proz. zeigte. Er vermutet mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit, den Schluß ableiten zu können, daß die hervorgerufene verminderte Sauerstoffversorgung des Organismus des Meerschweinchens es ist, welche die in Rede stehende Veränderung des Serums (Hämopoietinbildung) hervorruft.

---

[1]) *Carnot* und *Deflandre*, C. r. **143**, 384.

[2]) *Müller*, Arch. f. Hyg. **75**.

[3]) *Giribaldi*, Biochem. e terap. sperim. Jahrg. 7, 1920.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, diese Versuche zu wiederholen, sicherzustellen und zu erweitern, denn *Müller* hatte die Versuche an Mäusen und Meerschweinchen ausgeführt; die ersteren sind aber wegen ihrer geringen Blutmenge zu solchen Versuchen nicht sehr geeignet. Die zur einmaligen Blutkörperchenzählung benötigte geringe Blutmenge addiert sich in 1 bis 2 Tagen und wird relativ groß, so daß die Mäuse nach ein bis zwei Zählungen anämisch werden. Außerdem hat er Mäusen Meerschweinchenserum injiziert, so daß die heterologe Serumwirkung nicht auszuschließen ist.

Wir haben darum zu unseren Versuchen ausschließlich Kaninchen benutzt, welche eben wegen der erwähnten Ursachen zu solchen Versuchen viel besser geeignet sind.

Technik und Versuchsanordnung.

Zuerst haben wir bei den Kaninchen die Blutkörperchenzahl und den Hämoglobingehalt festgestellt; dies geschah für ersteres mit dem *Bürker*schen Blutkörperzählapparat, mit welchem mindestens 800 bis 1000 Zellen gezählt wurden, für letzteres mit dem *Sahli-Gowers*schen Apparat; darnach haben wir die Tiere gewogen und anämisiert. Die Anämisierung geschah durch die auspräparierte Karotis. Aus dem Gewicht der Tiere haben wir die ungefähr vorhandene Blutmenge berechnet. ($^1/_{16}$ des Körpergewichtes), und haben $^1/_4$ bis $^1/_3$ dieser Blutmenge entnommen, so daß an dem der Blutentnahme folgenden Tage die Blutkörperchenzählung eine Abnahme von 19 bis 37 Proz. (im Mittel 28 Proz.) zeigte. Nun blieb ein Tier zur Kontrolle unbehandelt, dem anderen wurden die in Frage stehenden Sera intraperitoneal in Mengen von 2 bis 3 ccm injiziert. Darnach wurde zuerst täglich, dann mit einigen Tagen Zwischenraum fortlaufend die Blutkörperchenzahl und der Hämoglobingehalt bestimmt.

Zur Herstellung eines luftverdünnten Raumes benutzten wir einen Exsikkator, in welchen wir das Tier hineinbrachten, und eine Wasserstrahlpumpe. Vor den Exsikkator und die Wasserstrahlpumpe waren zwei Gefäße eingeschaltet. Ein Gefäß mit Quecksilber gefüllt, welches als Manometer diente und durch welches zugleich die frische Luft in den Exsikkator hineingesaugt wurde; das zweite Gefäß diente zum Auffangen der beim Blasenwerfen des Quecksilbers entstandenen und übergesaugten Quecksilbertröpfchen. Mit dieser Anordnung erzeugten wir die zu unseren Versuchen benötigten Luftverdünnungen von 410 bis 480 mm Hg, was im Mittel dem ungefähren atmosphärischen Druck in der Höhe von 4000 bis 4500 m (Monte Rosa) entspricht. In diesem luftverdünnten Raume blieben die Tiere 24 bis 49 Stunden, sie bekamen Futter mit hinein, das sie in dieser Zeit verzehrten. Die Tiere befanden sich gut und zeigten wenig merkliche Dyspnoe. Nach 24- bis 49stündigem Aufenthalt in diesem luftverdünnten Raume haben wir den Tieren die benötigte Blutmenge aus der Karotis entnommen und deren Serum zu Einspritzungen benutzt.

Unsere Versuche können wir in fünf Gruppen einteilen:

Gruppe I. Hierher gehören fünf Tiere, die unbehandelt als Kontrolle dienten. Diese Tiere wurden nach Blutkörperchenzählung, wie schon erwähnt, anämisiert, und nachher jeden Tag wieder die Blutkörperchenzahl festgestellt.

Gruppe II. Zu dieser Gruppe gehören fünf Kaninchen. Nach Feststellung der Zellenzahl wurden sie anämisiert, die Abnahme der Blutkörperchenzahl nach 24 Stunden wieder festgestellt und ihnen nachher 2,5 ccm Serum von Kaninchen, die im luftverdünnten Raume waren, intraperitoneal injiziert. Dann folgte tägliche Blutkörperchenzählung.

Gruppe III (drei Kaninchen). Da sich ergab, daß im Serum von Tieren, die im luftverdünnten Raume waren, durch O_2-Mangel sich Änderungen einstellen, haben wir zur Prüfung dieser Veränderungen drei Tiere mit Serum von im luftverdünnten Raume gewesenen Kaninchen behandelt, welches Serum vorerst 15 bis 30 Minuten lang mit O_2 durchgelüftet wurde. Nach Blutkörperchenzählung, Anämisierung und nachher wieder festgestellter Zellenzahl Einspritzung von 2 bis 3 ccm dieses Serums intraperitoneal.

Gruppe IV. Drei Tieren haben wir nach Blutkörperchenzählung, Anämisierung und wiederholter Blutkörperchenzählung 3 bis 6 ccm Serum von normalen, gesunden, nicht behandelten Kaninchen intraperitoneal injiziert.

Gruppe V. Zusammen fünf Tiere. Drei Kaninchen wurden nach Blutkörperchenzählung und Anämisierung verschieden behandelt. Eines dieser Tiere blieb weiter 3 Tage hindurch im luftverdünnten Raume. Ein anderes bekam *3 Tage hindurch* pro Tag je 2 ccm Serum eines Kaninchens, welches im luftverdünnten Raume gelassen war; einem dritten wurden 3 ccm abzentrifugierter Milch intraperitoneal injiziert. Zwei Tiere wurden *nicht* anämisiert, und eines von diesen bekam täglich 3 Tage hindurch je 2 ccm Serum von normalen, ein zweites von Kaninchen, welche im luftverdünnten Raume gewesen waren.

In die Tabellen sind nur die Blutzellenwerte aufgenommen. Die Hämoglobinwerte sollen später erörtert werden. Neben die direkt gefundenen Zahlen sind die Differenzen gesetzt gegenüber den Normalwerten und den 24 Stunden nach der Anämisierung gefundenen, und zwar einerseits in absoluten Werten, andererseits in prozentischen Werten, wobei im letzteren Falle die vor bzw. 24 Stunden nach der Blutentnahme gewonnenen Werte zu 100 gesetzt wurden.

Beim Betrachten der Resultate können wir die Gruppen I und IV zusammenfassen, denn ihr Resultat ist das gleiche. Bei diesen zwei Gruppen — also bei den nicht behandelten Kontrolltieren und bei mit normalem Serum behandelten Tieren — *zeigte sich in den ersten Tagen nach der Entblutung eine fortschreitende Abnahme der roten Blutkörperchenzahl.* Eine Zunahme beginnt erst nach 3 bis 4 Tagen, um dann langsam zu steigen. Dasselbe zeigt sich beim Kaninchen in Gruppe V, welches 3 ccm Milch bekommen hatte.

Anders stellt sich die Sache bei Gruppe II und III, also bei Tieren, welche Serum von im luftverdünnten Raume gewesenen Kaninchen bekommen haben. *Bei diesen zeigt sich die bei der früheren Gruppe gefundene fortschreitende Abnahme nicht, sondern* **wir sehen eine Hemmung der nachträglichen Abnahme** *und eine sehr bald beginnende Zunahme an Tagen, wo die Kontrolltiere noch eine Abnahme zeigen.* Dabei ist das mit Sauerstoff behandelte Serum noch etwas wirksamer als das unbehandelte.

Fassen wir die Resultate von Gruppe I und den Gruppen II und III in Prozentzahlen zusammen, so bekommen wir Werte wie folgt (Tab. II):

Tabel

Nummer des Kaninchens	Blutkörperchenzahl vor der Anämisierung	Blutentnahme ccm	Blutkörperchenzahl nach der Anämisierung	Abnahme Proz.	1. Tag Blutkörperchenzahl	1. Tag Zu- oder Abnahme absolut	1. Tag Zu- oder Abnahme Proz.	2. Tag Blutkörperchenzahl	2. Tag Zu- oder Abnahme absolut	2. Tag Zu- oder Abnahme Proz.
Gruppe I. Unbehandelte										
2	5 860 000	35	3 700 000	— 37	3 760 000	— 2 100 000[1]) + 60 000[2])	— 36[1]) + 2[2])	3 900 000	— 1 960 000 + 200 000	— 33 + 6
5	5 900 000	28	4 490 000	— 24	3 250 000	— 2 650 000 — 1 240 000	— 45 — 31	3 700 000	— 2 200 000 — 790 000	— 38 — 18
9	6 600 000	15	4 900 000	— 26	4 380 000	— 2 220 000 — 520 000	— 34 — 11	4 550 000	— 2 050 000 — 350 000	— 30 — 4
15	5 550 000	35	4 140 000	— 26	4 600 000	— 950 000 + 460 000	— 17 + 12	4 660 000	— 890 000 + 520 000	— 19 + 13
16	5 910 000	18	4 340 000	— 27	3 560 000	— 2 350 000 — 780 000	— 41 — 48	3 170 000	— 2 740 000 — 1 170 000	— 47 — 27
Gruppe II. Nach der Anämisierung 2,5 ccm Serum intraperitoneal										
3	6 100 000	24	3 980 000	— 35	4 550 000	— 1 550 000 + 570 000	— 26 + 13	4 000 000	— 2 100 000 + 20 000	— 35 ± 0
4	6 000 000	25	4 660 000	— 23	4 560 000	— 1 440 000 — 100 000	— 24 — 3	4 960 000	— 1 040 000 + 300 000	— 18 + 5
14	5 500 000	28	3 800 000	— 31	3 790 000	— 1 710 000 — 10 000	— 31 — 1	—	— —	— —
20	4 700 000	23	3 500 000	— 26	3 220 000	— 1 480 000 — 280 000	— 32 — 8	3 600 000	— 1 100 000 + 100 000	— 24 + 3
22	4 840 000	20	3 650 000	— 25	3 100 000	— 1 740 000 — 550 000	— 36 — 6	5 070 000	+ 230 000 + 1 420 000	+ 4 + 38 ?
Gruppe III. Nach Anämisierung 3 ccm Serum intraperitoneal, welches von im Injektion 15 bis 30 Minuten lang										
8	5 800 000	17	4 450 000	— 24	4 760 000	— 1 040 000 + 310 000	— 18 + 7	5 790 000	— 10 000 + 1 340 000	— 1 + 30
10	6 300 000	18	4 600 000	— 27	4 900 000	— 1 400 000 + 300 000	— 23 + 6	5 330 000	— 770 000 + 930 000	— 13 + 18
13	3 700 000	14	3 000 000	— 19	3 140 000	— 560 000 + 140 000	— 15 + 5	3 180 000	— 520 000 + 180 000	— 13 + 5
Gruppe IV. Nach der Anämisierung										
12	4 200 000	16	2 930 000	— 31	2 480 000	— 1 790 000 — 520 000	— 43 — 20	2 410 000	— 1 790 000 ± 0	— 43 ± 0
17	5 950 000	15	4 440 000	— 26	3 260 000	— 2 690 000 — 1 140 000	— 45 — 27	3 980 000	— 1 970 000 — 460 000	— 33 — 9
19	6 000 000	23	3 800 000	— 37	3 800 000	— 2 200 000 ± 0	— 37 ± 0	3 070 000	— 2 930 000 — 430 000	— 50 — 23
Gruppe										
23	5 400 000	28	4 170 000	— 23	4 170 000	— 1 230 000 ± 0	— 23 ± 0	5 080 000	— 320 000 + 1 090 000	— 6 + 45
24	5 780 000	33	3 260 000	— 44	4 690 000	— 1 090 000 + 1 130 000	— 19 + 43	4 450 000	— 1 330 000 + 1 190 000	— 24 — 36
18	6 100 000	18	4 340 000	— 29	3 920 000	— 2 180 000 — 420 000	— 36 — 10	—	— —	— —
25	4 870 000	wurden nicht anämisiert		—	4 500 000	— 130 000	— 8	4 550 000	— 125 000	— 8
26	4 600 000			—	4 090 000	— 510 000	— 11	4 750 000	+ 150 000	+ 3

[1]) u. [2]) Die Zahlen der *oberen* Reihe bedeuten stets die Werte, die sich ergeben, wenn die *ursprüngliche* Blut

3. Tag			4. Tag			5. Tag					
Blutkörperchenzahl	Zu- oder Abnahme absolut	Proz.	Blutkörperchenzahl	Zu- oder Abnahme absolut	Proz.	Blutkörperchenzahl	Zu- oder Abnahme absolut	Proz.	Blutkörperchenzahl	Zu- oder Abnahme absolut	Proz.
Kontrolltiere.											
4200 000	— 1 660 000	— 28	—	—	—	4 230 000	— 1 630 000	—28	—	—	—
	+ 500 000	+ 14		—	—		+ 530 000	+14		—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	5 000 000	13. Tag — 900 000	—16
	—	—		—	—		—	—		+ 10 000	± 0
4 740 000	— 1 860 000	— 26	—	—	—	4 950 000	— 1 650 000	—27	—	—	—
	— 160 000	— 4		—	—		+ 50 000	+ 1		—	—
3 830 000	— 1 720 000	— 31	—	—	—	—	—	—	5 000 000	8. Tag — 550 000	—10
	— 310 000	— 8		—	—		—	—		+ 860 000	+21
960 00 0	— 1 950 000	— 33	4 920 000	— 990 000	— 17	—	-	—	5 420 000	— 470 000	— 9
	— 380 000	— 9		+ 580 000	+ 12		—	—		+ 1 080 000	+24
injiziert (von Kaninchen, die im luftverdünnten Raume waren).											
4 300 000	— 1 800 000	— 30	—	—	—	4 350 000	— 1 750 000	—30	4 630 000	13. Tag — 14 70 000	—24
	+ 320 000	+ 8		—	—		+ 370 000	+ 8		+ 650 000	+16
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—		—	—		—	—		—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—		—	—		—	—		—	—
3 700 000	— 1 000 000	— 22	3 800 000	— 900 000	— 10	—	—	—	—	—	—
	+ 200 000	+ 4		+ 300 000	+ 8		—	—		—	—
4 710 000	— 130 000	— 3	4 560 000	— 280 000	— 16	—	—	—	4 700 000	6. Tag — 140 000	— 3
	+ 940 000	+ 29		+ 910 000	+ 28		—	—		+ 950 000	+29
luftverdünnten Raume gewesenen Kaninchen entnommen wurde und vor der mit O_2 durchgelüftet wurde.											
5800 000	± 0	± 0	—	—	—	5 920 000	+ 120 000	+ 2	—	—	—
	+ 1 350 000	+ 30		—	—		+ 1 470 000	+33		—	—
5295 000	— 1 005 000	— 16	—	—	—	5 470 000	— 830 000	—14	6 550 000	12. Tag + 230 000	+ 3
	+ 695 000	+ 17		—	—		+ 870 000	+18		+ 1 930 000	+33
3660 000	— 40 000	— 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	+ 660 000	+ 22		—	—		—	—		—	—
3 bis 6 ccm Normalserum intraperitoneal.											
2680 000	— 1 520 000	— 36	—	—	—	3 750 000	8. Tag — 450 000	—11	2 500 000	12. Tag — 1 700 000	—41
	— 250 000	— 9		—	—		+ 820 000	+27		— 430 000	—16
3 200 000	— 2 750 000	— 47	4 480 000	— 1 470 000	— 25	—	—	—	—	—	—
	— 1 240 000	— 28		+ 20 000	± 0		—	—		—	—
3 950 000	— 2 050 000	— 34	4 830 000	— 1 170 000	— 15	—	—	—	—	—	—
	+ 150 000	+ 3		+ 1 030 000	+ 27		—	—		—	—
V.											
4 900 000	— 500 000	— 9	4 900 000	— 500 000	— 9	Nach 29stündigem Aufenthalt im luftverd. Raume bei 441 mm Hg anämisiert; war nachher jeden Tag 6 Std. lang im luftverd. Raume bei 441 mm Hg					
	+ 730 000	+ 17		+ 730 000	+ 17						
4 450 000	— 1 330 000	— 24	4 630 000	— 1 115 000	— 20	3 Tage täglich 2 ccm Serum vom Kaninchen, welches im luftverdünnten Raume war.					
	+ 1 190 000	+ 36		+ 1 370 000	+ 43						
—	—	—	—	—	—	3 ccm Milch intraperitoneal.					
	—	—		—	—						
4 500 000	— 50 000	— 1	—	—	—	3 Tage täglich 2 ccm Serum vom Kaninchen, welches im luftverdünnten Raume war.					
4 880 000	+ 280 000	+ 6	4 680 000	+ 80 000	+ 2	3 Tage täglich 2 ccm Serum v. norm. Kaninchen.					

ellenzahl zugrunde gelegt wird, die der *unteren*, wenn von der Zellenzahl nach der Anämisierung ausgegangen wird.

Tabelle II. Unbehandelte Kontrolltiere (Blutkörperchenzahl in Prozenten).

Kaninchen Nr.	2		5		9		15		26		Tagesmittel	
Vor der Blutentnahme Proz.	100	—	100	—	100	—	100	—	100	—	**100**	—
Nach „ „ „	63	100	74	100	74	100	75	100	73	100	**71^{8}**	**100**
Tag 1	64	102	55	69	66	89	83	112	59	82	**66^{6}**	**90^{8}**
„ 2	67	105	62	82	70	96	84	113	53	73	**66**	**93^{8}**
„ 3	72	114	—	—	74	96	69	108	66	91	**72^{7}**	**102^{2}**
„ 4	—	—	—	—	—	—	—	—	83	112	**83**	**112**
„ 5	72	114	—	—	75	101	—	—	98	124	**81**	**113**
„ 6	84	134	—	—	—	—	—	—	—	—	**84**	**134**

Tabelle III. Mit Serum (von im luftverdünnten Raume gewesenen Kaninchen) behandelte Tiere.

Kaninchen Nr.	3		4		14		20		22		8		10		13		Tagesmittel	
Vor der Blutentnahme Proz. .	100	—	100	—	100	—	100	—	100	—	100	—	100	—	100	—	**100**	—
Nach der Blutentnahme Proz. .	65	100	77	100	69	100	74	100	75	100	76	100	73	100	81	100	**70**	**100**
Tag 1	74	113	76	97	69	100	68	92	66	85	82	107	77	106	85	103	**74^{6}**	**100^{3}**
„ 2	65	100	82	105	—	—	76	102	104	138	99	130	87	118	87	104	**85^{7}**	**113^{8}**
„ 3	70	108	—	—	—	—	78	105	97	129	100	130	84	117	101	122	**88^{3}**	**117^{7}**
„ 4	—	—	—	—	—	—	90	108	84	128	—	—	—	—	—	—	**87**	**118**
„ 5	70	108	—	—	—	—	—	—	—	—	102	131	86	118	—	—	**86**	**119**
„ 6	76	115	—	—	—	—	—	—	84	128	—	—	—	—	—	—	**86**	**121**

Es geht aus diesen Tabellen deutlich hervor, daß, *während bei den Kontrolltieren an den der Blutentnahme folgenden 2 Tagen eine weitere Verminderung der Blutkörperchenzahl zu erfolgen pflegt, bei behandelten Tieren keine Abnahme, sondern sogar eine Zunahme von im Mittel 13,8 Proz. schon am zweiten Tage die Regel ist.* Die Kurve (Tabelle III) zeigt die Verhältnisse sehr klar.

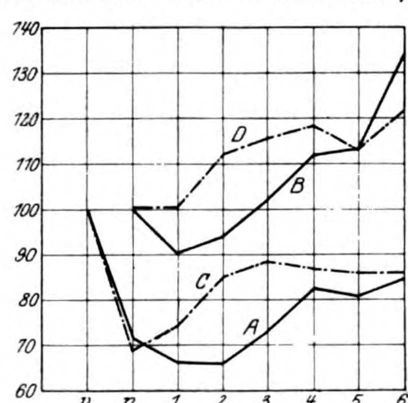


Abb. 1. *v* Blutzellenzahl *vor* der Blutentnahme in Proz. *n* Blutzellenzahl *nach* der Blutentnahme in Proz. *A* u. *B* Kontrolltiere. *C* u. *D* gespritzte Tiere. *A* u. *C* bezogen auf die Normalwerte = 100. *B* u. *D* bezogen auf die 24 Stunden nach der Anämisierung gefundenen Werte = 100.

Es handelt sich um schnellere Anregung zum Wiederersatz, denn selbst in Wochen kommt es *nicht zu einer Steigerung der Zellenzahl über den Ursprungswert hinaus.* Dem entspricht, daß bei nicht anämisch gemachten Kaninchen (Gruppe V) das Serum keine Zellenvermehrung bewirkte, auch wenn das Serum 3 Tage hindurch gegeben wurde.

Wenn die Dosis gesteigert wird dadurch, daß das Serum der im luftverdünnten Raume gewesenen Tiere täglich gegeben wird, und zwar mehrere Tage hindurch, so ist die Wirkung im Prinzip dieselbe, d. h. eine Vermeidung des weiteren Absinkens und ein schnellerer Wiederersatz — schneller noch

als nach einmaliger Injektion —, aber keine Steigerung über die Ursprungswerte hinaus.

Zusammenfassend kann man sagen, daß jedenfalls ein Einfluß auf die Wiederzunahme der Zellen im Blute sicher ist. Jedenfalls enthält das Serum die mit dem Blutwiederersatz in Beziehung stehenden Substanzen. Diese Substanzen wirken bei anämischen Tieren genau so, wie der Aufenthalt im luftverdünnten Raume selber, denn wenn das anämisierte Tier unter Luftverdünnung gehalten wird (s. Gruppe V, Kaninchen Nr. 23), so nimmt der Wiederersatz seines Blutes denselben Gang, wenn auch in beschleunigtem Maße, wie es bei Einspritzung von Serum unter Luftverdünnung gehaltener Tiere der Fall ist. Dagegen besteht, wie es scheint, bei *normalen* Tieren ein Unterschied zwischen der Wirkung des Serums von Tieren, die sich im luftverdünnten Raume befunden haben, und der Wirkung des Aufenthaltes im luftverdünnten Raume selber, denn letzterer bewirkt eine Zunahme der Zellen im Laufe von einigen Wochen über das normale Maß hinaus, erstere erzeugt aber diese Hyperglobulie nicht. Das geht aus den Versuchen hervor, in denen normalen Kaninchen das Serum von Tieren injiziert wurde, die sich im luftverdünnten Raume befunden haben — sogar wenn die Injizierung mehrere Tage hindurch geschah —, ohne daß die Zellenzahl im Blute zunahm (vgl. Gruppe V, Kaninchen Nr. 25 und 26).

Wie sollen wir diese Wirkung auffassen? Man könnte an eine *Proteinkörperwirkung* denken. Um über diese Möglichkeit zu entscheiden, haben wir einer Reihe von Kaninchen (Gruppe IV) normales Serum injiziert und einem Kaninchen 3 ccm Milch (in Gruppe V). Eine deutliche Hemmung der Wirkung der Blutentziehung war aber bei keinem zu konstatieren. Man muß also an eine *spezifische Wirkung* denken. *Am nächsten liegt die Vermutung, daß die Wirkung über das Knochenmark geht, und daß das Knochenmark beim Aufenthalt im luftverdünnten Raume einen Reiz empfängt, Substanzen zu bilden und an das Serum abzugeben, welche fähig sind, den Wiederersatz des Blutes zu beschleunigen.* Die Substanzen scheinen aber nicht dazu fähig zu sein, sicher nicht in hervorragendem Maße, die Zellenzahl über die Norm hinaus zu vermehren. Für derart wirkende Substanzen ist, wie erwähnt, der Name „*Hämopoietine*“ benutzt worden (*Carnot*). Der Name besagt nichts über das Wesen dieser Substanzen. Darüber, ob diese Hämopoietine eine Hämopoiesis erzeugen, sagen auch unsere Versuche nichts aus, da ja *nach unseren Versuchen und Erfahrungen durch sie zwar ein Wiederersatz, aber keine Mehrbildung angeregt wird.*

Es wäre eine weitere Frage, ob die Bildung und Abgabe der Hämopoietine an das Blut mit Vorgängen einhergeht, die auf eine Anregung zu vermehrter Blutneubildung deuten, oder ob nur eine beschleunigte

Ausschwemmung von Zellen aus dem Knochenmark vor sich geht. Eine Scheidung dieser beiden Vorgänge voneinander ist auf Grund der Betrachtung des Blutes allein nicht möglich. Man kann aus seinem Verhalten nur auf einen vermehrten Übertritt irgendwelcher Zellen in das Blut schließen, und zwar 1., wenn kernhaltige rote Blutkörperchen sich im Blute befänden; 2. wenn im Blute Anisocytose oder eine auffallend große Zahl abnorm großer Blutzellen zu finden wäre; 3. wenn das Blut vermehrten O_2-Verbrauch zeigte[1]).

Zuntz, Loewy, Müller und *Caspari*[2]) haben durch mikroskopische Untersuchungen gezeigt, daß bei Tieren, die längere Zeit im Höhenklima waren, die äußere Schicht des roten Markes dicker ist und mehr rote Blutkörperchen enthält, als das bei Tieren im Tieflande der Fall ist. Aus dieser Tatsache könnte man auf vermehrte Blutbildung schließen, und dementsprechend müßten im Blute kernhaltige rote Blutkörperchen vorhanden sein. Tatsächlich haben aber außer *Schauman* und *Rosenqvist*[3]), die ihre Tiere *sehr lange* der Luftverdünnung aussetzten, nie Forscher kernhaltige rote Blutkörperchen gefunden, nur höchstens eine Anisocytose. Wir fanden auch nichts Deutliches bei sorgfältigster Durchsicht unserer Trockenpräparate in bezug auf das Vorkommen kernhaltiger roter Blutkörperchen, aber wir fanden eine Anisocytose und Polychromasie und — was eine größere Bedeutung hat — abnorm große rote Blutkörperchen.

Tabelle IV zeigt die Prozentzahl der verschiedenen Durchmesser der roten Blutkörperchen eines gesunden Kaninchens, welches in Davos bei einem Barometerdruck von im Mittel 630 mm Hg lebte, verglichen mit einem Kaninchen, das 49 Stunden einer Luftverdünnung von 441 mm Hg ausgesetzt war.

Tabelle IV.

Durchmesser der roten Blutkörperchen	
bei normalen Kaninchen	beim Kaninchen, welches 49 Std. im luftverdünnten Raume von 441 mm Hg war
4 Proz. zwischen 5,2 bis 6,0 μ	6 Proz. zwischen 5,2 bis 6,0 μ
34 „ „ 6,0 „ 6,9 μ	34 „ „ 6,0 „ 6,9 μ
51 „ „ 6,9 „ 7,8 μ	21 „ „ 6,9 „ 7,8 μ
11 „ „ 7,8 „ (8,1 μ)	29 „ „ 7,8 „ 8,7 μ
	11 „ „ 8,7 „ (9,0 μ)
mittlerer Durchmesser . 6,5 μ	mittlerer Durchmesser . 6,9 μ

[1]) *Morawitz* und *Masing,* Höhenklima und Blutbildung, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **38**; *Masing,* Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **66**; *Morawitz,* ebendaselbst **60**.

[2]) *Zuntz, Loewy, Müller* und *Caspari,* Höhenklima und Bergwanderungen. Berlin 1906. Tafel I und II. *Loewy* und *Müller,* Deutsch. med. Wochenschr., 1904, S. 122.

[3]) *Schauman* und *Rosenqvist,* Über die Natur der Blutveränderungen im Höhenklima, Zeitschr. f. klin. Med. **35**, 1898.

Während beim erstgenannten Tiere der mittlere Durchmesser der roten Blutkörperchen 6,5 μ beträgt, beträgt er beim letzteren Tiere 6,9 μ, also 0,5 μ mehr. Außerdem waren beim letzteren Kaninchen 11 Proz. Blutkörperchen mit einem Durchmesser von 8,7 μ (dabei auch einige mit 9,0 μ) zu sehen, wie solche beim normalen Tiere überhaupt nicht zu finden waren.

Was die vermehrte O_2-Zehrung betrifft, haben wir Versuche mit dem *Winterstein*schen Mikrorespirometer ausgeführt. Die Resultate sind positiv ausgefallen, denn *das Blut von der Luftverdünnung ausgesetzten Tieren hat mehr O_2 verzehrt als das Blut von normalen Tieren.* Die darauf bezüglichen Versuche werden in der folgenden Abhandlung mitgeteilt. Sie sowie die vorstehend mitgeteilten Blutveränderungen sprechen jedenfalls dafür, daß neben oder mit der Hämopoietinbildung Vorgänge ablaufen, die zu einem gesteigerten Zellübertritt ins Blut führen.

Die Wirkung der Luftverdünnung auf den Gaswechsel des Blutes.

Von

A. Loewy (Davos) und **Julius Förster** (Budapest).

(Aus dem Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1923.)

Die vorstehenden Untersuchungen von *Förster* hatten im Anschluß an ältere Untersuchungen ergeben, daß im Blutserum von Kaninchen, die unter Luftverdünnung gehalten waren, Stoffe enthalten sind, die, intraperitoneal Tieren der gleichen Art injiziert, den Blutersatz nach Blutentziehungen anzuregen vermögen, und ferner, daß die Zellen solchen Blutes Besonderheiten zeigen, wie man sie bei der Blutregeneration findet: Anisocytose höheren Grades und Polychromasie bei den vorhandenen Makrocyten. Das Wesen dieser Wirkung ist vorläufig noch unerklärt, aber sicherlich handelt es sich nicht um unmittelbare Blutveränderungen, vielmehr ist anzunehmen, daß sie von Organen aus hervorgerufen werden, die primär durch die Luftverdünnung beeinflußt werden. Es liegt auf Grund experimenteller Erfahrungen nahe, in erster Linie an das Knochenmark zu denken, an dem Veränderungen im Sinne einer vermehrten Blutbildung schon beobachtet worden sind[1]).

Findet diese reichlich und schnell statt, so macht sie sich im Blute selbst durch das Auftreten kernhaltiger roter Zellen geltend; erfolgt sie langsam, so finden sich keinerlei kernhaltige Zellen. Aber, wie *Warburg*[2]) und *Morawitz*[3]) feststellten, zeigt das Blut von Tieren, dem mehr junge Blutzellen zugeführt werden als dem normaler erwachsener, z. B. das Blut von *jungen* Tieren oder das durch Aderlässe *blutarm* gemachter, eine Eigentümlichkeit darin, daß es einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch hat. Es war also zu erwarten, daß beim Aufenthalt in einem genügend luftverdünnten Raume und auch im Höhenklima sich eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs des Blutes finden würde, falls ein genügend schneller Übergang junger Zellen

[1]) *Zuntz, Loewy, Müller* und *Caspari*, Höhenklima und Bergwanderungen, S. 198ff., Berlin 1906.

[2]) *Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 112.

[3]) *Morawitz*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **60**, 298.

ins Blut vor sich ging. Die einzigen in diesem Sinne ausgeführten Versuche stammen von *Masing* und *Morawitz*[1]). Sie bestimmten an sich den Sauerstoffverbrauch des Blutes einerseits in Heidelberg, andererseits auf dem Col d'Olen in etwa 3000 m Höhe bei einem achttägigen Aufenthalt. Sie fanden die beim Menschen nur geringe Sauerstoffzehrung (0,5 bis 1,0 Vol.-Proz. in 5 Stunden bei 37°) in gleicher Weise in der Höhe wie im Tieflande. Dabei war die Zahl der Erythrocyten bei *Morawitz* um etwa 10 Proz., bei *Masing* um 7¾ Proz. gestiegen.

Das Ergebnis ist auffallend. *Masing* und *Morawitz* denken schon zu seiner Erklärung daran, daß die zu erwartende Zunahme unterhalb der Schwelle der Methode geblieben sein könnte. Sie bedienten sich der *Haldane-Barcroft*schen Ferricyanidmethode, deren Fehlergrenze sie mit 0,6 Vol.-Proz. angeben. Aber die Fehlergrenze kann über diesen Wert unter Umständen weit hinausgehen. Auch in den Versuchen an *E. Masing* scheint das der Fall gewesen zu sein, wenigstens stehen die Blutsauerstoffwerte auf dem Col d'Olen nicht mit der Blutzellenzahl in Einklang. Im Mittel war der Sauerstoffgehalt in Heidelberg 20,55 Vol.-Proz. bei 5,4 Millionen Erythrocyten. Auf dem Col d'Olen betrugen letztere in einem Falle 6,1 Millionen bei 21,8 Vol.-Proz. O_2, in einem zweiten dagegen 5,3 Millionen bei 23 Vol.-Proz. Im Gesamtmittel berechnen sich 22,37 Vol.-Proz. auf dem Col d'Olen bei im Mittel 5,8 Millionen Erythrocyten. Die Zunahme an letzteren gegenüber Heidelberg beträgt 7,7 Proz., die des Sauerstoffgehaltes etwa 9 Proz. Beide Werte stimmen scheinbar gut überein. Aber wenn man berücksichtigt, daß die maximale Sauerstoffaufnahme auf dem Col d'Olen geringer sein muß als in Heidelberg, entsprechend dem verminderten Barometerdruck, würde sich, selbst unter der Annahme, daß der Überschuß an Blutzellen gegenüber Heidelberg die gleiche Sauerstoffkapazität hätte wie alle übrigen Zellen, nur ein Sauerstoffgehalt von etwa 21 Vol.-Proz. berechnen, d. h. also 1,37 Proz. weniger als gefunden. Diese Rechnung soll nur zeigen, daß bei Verwendung von Menschenblut mit seiner sehr geringen Zehrung etwaige Steigerungen dieser wirklich, wie *Masing* und *Morawitz* vermuten, in die Fehlerbreite ihrer Methode fallen könnten.

Wir haben deshalb die Frage, ob beim Aufenthalt im luftverdünnten Raume das Blut eine erhöhte Fähigkeit zur Sauerstoffzehrung erhält, nochmals geprüft, unter Benutzung von Kaninchenblut, das an sich eine erheblich höhere Sauerstoffzehrung hat als Menschenblut, und unter Verwendung einer Apparatur, die kleine Ausschläge besser erkennen und messen läßt als die *Barcroft*sche, nämlich des Mikrorespirometers von *Winterstein*[2]).

[1]) *Masing* u. *Morawitz*, D. Arch. f. klin. Med. 98, 301. — [2]) *H. Winterstein*, diese Zeitschr. 46, 440, 1912; Zeitschr. f. biol. Technik 3, 246, 1913.

Das Wesen des Apparates setzen wir als bekannt voraus und bemerken nur, daß wir die neueste Änderung desselben benutzten, bei der an einem Quecksilbermanometer der Verbrauch an Sauerstoff direkt abgelesen werden kann. Der Apparat wurde auf der einen Seite mit 1 ccm Tyrodelösung, auf der anderen mit 1 ccm Blut gefüllt, das mit Sauerstoff gesättigt wurde. Ebenso wurde das Blutgefäß mit Sauerstoff gefüllt. Das im Blutgefäß vorhandene Schälchen wurde zur Hälfte mit 3proz. Kalilauge gefüllt und ein überstehendes Fließpapierstück hineingegeben. Nach dem Vollsaugen dieses mit der Kalilauge blieb noch ein Rest dieser am Boden des Gefäßes. Das Respirometer wurde mechanisch in einer Wasserwanne bei 37,5 bis 38,5° C geschüttelt. Die Ablesungen begannen, nachdem Temperaturausgleich eingetreten war und geschahen fast ausnahmslos von 10 zu 10 Minuten.

Zunächst verwendeten wir Blut *verschiedener* Tiere zur Vergleichung der Sauerstoffzehrung beim Aufenthalt einerseits unter dem in Davos herrschenden Barometerdruck von im Mittel 630 mm, andererseits nach 24- bis 33stündigem Aufenthalt bei etwa 430 bis 460 mm Barometerdruck. Später aber benutzten wir die *gleichen* Tiere zur Bestimmung der Sauerstoffzehrung sowohl vor wie nach dem Aufenthalt im luftverdünnten Raume. Zum Teil wurde auch noch die Sauerstoffzehrung des Blutes bestimmt, 24 Stunden nachdem im Anschluß an den Aufenthalt im luftverdünnten Raume ein Aderlaß von etwa einem Viertel der im Tiere anzunehmenden Blutmenge gemacht war. Letzteres Verfahren ist jedenfalls sicherer als ersteres, da doch nicht unerhebliche Schwankungen in der Sauerstoffzehrung von Tier zu Tier vorhanden sind, wie die folgende Tabelle erkennen läßt. Aber auch die Benutzung *verschiedener* Tiere zur Vergleichung der Sauerstoffzehrung bei dem herrschenden Atmosphärendruck und nach Aufenthalt unter Luftverdünnung erwies sich als zulässig, weil, wie sich zeigen wird, die normalen Sauerstoffzehrungswerte stets, wenn auch in verschiedenem Grade, niedriger liegen als die nach dem Aufenthalt in verdünnter Luft gefundenen.

Die Einrichtungen zur Herstellung und Lüftung der Unterdruckkammer waren die gleichen, wie sie in der voraufgehenden Arbeit von *Förster* geschildert wurden.

Unsere Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. Zu Tabelle I ist zu bemerken, daß die direkt gefundenen Zahlenwerte die Sauerstoffzehrung von 1 ccm Blut in Kubikmillimetern angeben, und daß diese auf 100 Blut umgerechnet wurden. Die Einzelwerte sind zu Mittelwerten zusammengefaßt, und neben den direkt berechneten Mittelwerten sind die auf 0° 760 mm reduzierten wiedergegeben, um sie mit anderen, unter anderen Verhältnissen gefundenen vergleichbar zu machen. Tabelle II enthält die Sauerstoffzehrung

umgerechnet auf Volumprozente und Stunde aus den Mittelwerten, und zwar auch wieder die direkt berechneten und die reduzierten Zahlen.

Tabelle I.

Sauerstoffverbrauch von je 1 ccm Blut in 10 Minuten in Kubikmillimetern.

Nr.	1.		2.		3.		4a.		5a.	
	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert
A Normalblut	8,2 *	5,986	4,02	—	7,7	—	7,5	—	6,0	—
	—	—	4,30	—	6,3	—	8,0	—	4,5	—
	—	—	—	—	6,0	—	6,5	—	6,0	—
	—	—	—	—	4,1	—	7,5	—	5,5	—
Mittel	8,2	**5,986**	4,165	**3,039**	6,025	**4,399**	7,375	**5,384**	5,5	**3,964**

Gesamtmittel: abgelesen = **6,253**; reduziert = **4,555.**

* 3 Wochen zuvor ein Aderlaß. Blutzellenzahl hat die Norm fast wieder erreicht.

Nr.	6.		7.		4b.		4c.		4d.		5b.	
	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert	abgelesen	reduziert
B Nach Aufenthalt unter Luftverdünnung	14,4	—	12,4	—	10,0	—	9,5	—	11,5	—	12,50	—
	15,8	—	—	—	10,0	—	7,0	—	(18,0)	—	18,0	—
	10,2	—	—	—	10,0	—	8,5	—	12,0	—	18,0	—
	—	—	—	—	9,5	—	8,5	—	13,0	—	—	—
	—	—	—	—	(16,0)	—	(13,5)	—	—	—	—	—
Mittel	13,47	**9,834**	12,4	**9,044**	9,875	**7,209**	8,375	**6,104**	12,17	**8,890**	16,17	11,637

Gesamtmittel: abgelesen = **12,054,** reduziert = **8,787.**

(Die eingeklammerten Werte sind *nicht* zur Berechnung der Mittelwerte benutzt.)

Nr.	4e.	
	abgelesen	reduziert
C Nach Luftverdünnung und folgendem Aderlaß	10,0	—
	10,0	—
Mittel	10,0	7,300

Die Tabelle I gibt im oberen Teile (A) die im normalen Blute von fünf Kaninchen für je 10 Minuten gewonnenen Sauerstoffverbrauchswerte. Sie liegen nicht unbeträchtlich auseinander, wobei der in Versuch 1 gefundene höchste Wert — von fast 6 cmm reduziert — vielleicht noch durch einen 3 Wochen zuvor an dem Tiere vorgenommenen Aderlaß beeinflußt ist. Bei den übrigen Werten liegt der höchste mit reduziert 5,384 cmm um fast 78 Proz. über dem niedrigsten mit 3 cmm. Das Mittel ergibt reduziert 4,555 cmm.

Weit höher liegt aber der Sauerstoffverbrauch des Blutes bei denjenigen Tieren, die im luftverdünnten Raume gewesen waren. Nur ein *einziger* von den 21 Werten liegt unter dem *Maximum* der normalen Werte, alle anderen darüber, und zwar beträchtlich bei den Tieren 5, 6 und 7, weniger bei Tier 4.

Angesichts der Schwankungen, die die Normaltiere darbieten, haben wir bei zwei Tieren den Sauerstoffverbrauch ihres Blutes sowohl im Normalzustande, wie nach dem Aufenthalt unter Luftverdünnung verglichen. Es sind die Tiere 4 und 5. Der Befund ist der gleiche, und gerade bei Tier 5 findet sich die höchste Steigerung, bis fast zum Dreifachen der normalen Werte. Bei Tier 4 wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Blutentnahme — die in Versuch 4b und 5b aus der Karotis erfolgte, sonst aus den Ohrgefäßen — die Sauerstoffzehrung untersucht. Es finden sich zwischen 4b und 4d Differenzen in den Mittelwerten, die aber nicht erheblich sind. Dagegen zeigen die verschiedenen Bestimmungen der *gleichen* Blutprobe neben je drei bis vier gut übereinstimmenden Werten einzelne ganz stark von den übrigen abweichende. Eine Ursache dafür vermögen wir nicht anzugeben, da die Technik bis in alle Einzelheiten stets die gleiche war. In allen Fällen handelt es sich um abnorm *hohen* Sauerstoffverbrauch. Bei der Berechnung der Mittelwerte haben wir diese (in der Tabelle eingeklammerten) Einzelwerte *nicht* mit verwertet. Aber auch ohne diese sind die Ergebnisse deutlich. Bei Tier 4 ist der Sauerstoffverbrauch, nachdem es der Luftverdünnung ausgesetzt war, um 37 Proz. gestiegen, bei Tier 5 um fast 200 Proz.

Faßt man, was das richtigste ist, alle Mittelwerte der einzelnen Versuche zu einem Gesamtmittel zusammen, so stellt sich der Sauerstoffverbrauch für das Normalblut zu **4,555 cmm**, für 1 ccm Blut und 10 Minuten Dauer gegen **8,787 cmm**, d. h. die Steigerung beträgt im Gesamtmittel gegen **93 Proz.**

Tabelle II gibt die Mittelwerte des Sauerstoffverbrauchs, berechnet auf 100 ccm Blut und Stunde.

Tabelle II.

Mittelwerte des Sauerstoffverbrauchs pro 100 ccm Blut und Stunde.

A	Normalblut	abgelesen = 3,7518 ccm;	reduziert = **2,733** ccm
B	Nach Aufenthalt unter Luftverdünnung . . .	„ = 7,232 „	„ = **5,2722** „

Sie betragen **2,733 ccm** normal gegen **5,272 ccm** nach Luftverdünnung.

Es ist festgestellt, daß ein gesteigerter Gaswechsel der roten Blutzellen der Säugetiere und des Menschen sich unter Verhältnissen findet, in denen ein erhöhter Gehalt an jugendlichen roten Blutzellen vorhanden ist, wenn es sich nicht um eine erhebliche Leukocytose handelt,

die in unseren Versuchen nicht vorlag. Dabei braucht das Blut nicht reich an kern*haltigen* Zellen zu sein. Auch kern*lose* jugendliche Zellen haben, wie die schon erwähnten Versuche von *Warburg*[1]) und *Morawitz*[2]) zeigen, einen über die Norm erhöhten Sauerstoffverbrauch, so die Blutzellen ganz junger Tiere (Kaninchen), und mehr noch die anämisch gemachter, bei denen das Blut sich regeneriert. Dabei zeigt sich im gefärbten Blutpräparat eine Polychromasie, und bei schwer anämischen Individuen ist eine Zunahme des mittleren Durchmessers der roten Blutzellen gefunden worden. So ist ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch des Blutes ein Zeichen für die Gegenwart jugendlicher roter Zellen bei Säugetieren und beim Menschen. In unserem Falle dürfen wir diesen Zusammenhang als Folge des Aufenthaltes im luftverdünnten Raume um so eher annehmen, als wir zugleich die eben genannten färberischen und Formveränderungen der roten Blutzellen feststellen konnten. In der *Förster*schen Arbeit ist mitgeteilt, in welchem Umfange sich der Durchmesser der Erythrocyten nach dem Aufenthalt in der verdünnten Luft vergrößert hat und in welchem Prozentsatz sich Makrocyten fanden. Auch Polychromasie war an den großen Zellen sichtbar. Nicht dagegen fanden sich mit Ausnahme eines zweifelhaften Normoblasten kernhaltige Zellen. Das ist mit der verhältnismäßig kurzen Dauer des Verbleibens unter Luftverdünnung zu erklären. Sieht man die Versuche von *Schauman* und *Rosenqvist*[3]) durch, so erkennt man, daß kernhaltige Zellen in größerer Menge sich im Blute ihrer der Luftverdünnung ausgesetzten Tiere erst zeigten, nachdem diese viele Tage bereits unter Luftverdünnung gewesen waren.

Unsere Versuche ergeben somit, daß schon ein Aufenthalt von 24 Stunden unter einem Barometerdruck, der einer Höhe von 4000 bis 4500 m entsprechen würde, bei Kaninchen wenigstens, und zwar bei solchen, die ständig in 1550 m Höhe gelebt hatten, zu Veränderungen des Blutes führt, welche sich im Gaswechsel des Blutes und in Übereinstimmung damit auch mikroskopisch in der Weise darstellen, wie man es *bei gesteigerter Blutbildung* zu finden gewohnt ist.

Die kurze, und, zwar erhebliche, aber nicht übertriebene Luftverdünnung hat also zu einer Reizung der blutbildenden Organe geführt, die zu einer gesteigerten Abgabe junger Zellen an das Blut führte. Ob und inwieweit hiermit die Fähigkeit des Serums dieser Tiere, die Blutregeneration anzuregen, in Zusammenhang steht, eine Fähigkeit, die sich aus der voranstehenden Arbeit von *Förster* für die gleichen Tiere ergeben hat, muß weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

[1]) *Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 112.
[2]) *Morawitz*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **60**, 298.
[3]) *Schauman* und *Rosenqvist*, Zeitschr. f. klin. Med. **35**, 1898.

Der Eiweißaufbau, insbesondere das Globulin-Albuminverhältnis (Eiweißquotient) in Immunseris.

Von

Stephan Bächer und Mag. Maria Kosian.

(Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institut, Wien.)

(Eingegangen am 1. Januar 1924.)

Seit in den grundlegenden Versuchen *Hofmeisters* und seiner Schüler die Trennung verschiedener Eiweißkörper im Serum durch Aussalzen mit Neutralsalzen, vor allem Ammonsulfat, systematisch durchgeführt worden und *E. P. Pick* gezeigt hatte, daß im Diphtherieserum die Antikörper ausschließlich an die mittleren Aussalzungsfraktionen (Euglobulin und Pseudoglobulin *Hofmeisters*) gebunden sind, ist das quantitative Verhältnis der Fraktionen zueinander und dessen Zusammenhang mit der Immunisierung der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, ohne daß die für die Serumkonzentrierung bedeutsame Frage abschließend geklärt werden konnte.

Einige Autoren konstatierten zunächst eine *Erhöhung des Gesamteiweißgehaltes* im Verlaufe der Immunisierung. *Szontag* und *Wellmann* geben einen Durchschnittswert von 7,820 Proz. im Diphtherieserum gegenüber 7,567 Proz. im Normalpferdeserum an, doch nehmen sie keinen Zusammenhang von Eiweißgehalt und Antitoxingehalt an. Zu gleichen Ergebnissen kamen ferner *Butjagin, Langstein* und *Mayer*, sowie *P. Th. Müller*, andere dagegen fanden den Gesamteiweißgehalt unverändert (*Beljaeff, Moll*), oder die Veränderung unwesentlich oder inkonstant (*Joachim, Ledingham*).

Das Hauptaugenmerk richtete sich aber von vornherein auf das relative *Verhältnis der einzelnen Eiweißfraktionen*, nachdem die Zugehörigkeit der Antikörper zu bestimmten Fraktionen auf Grund der Befunde *E. P. Picks* allgemein angenommen wurde. Doch schon *E. P. Pick* hatte eine merkwürdige Differenz bezüglich der Verteilung von Diphtherieantitoxin im Pferde- und Ziegenserum gefunden. In ersterem sollten sie ausschließlich im Pseudoglobulin, in letzterem im Euglobulin enthalten sein. Allerdings fanden *Porges* und *Pribram* dieses Verhalten inkonstant. Ausschließlich in den Euglobulinen wies *E. P. Pick* auch die Choleralysine bei der Ziege

nach, während *Pfeiffer* und *Proskauer* sie sowohl in der Globulin- als auch in der Albuminfraktion feststellten. Auch die Bakteriotropine (für Streptokokken) fallen nach *Rodhain* mit den Euglobulinen aus, die Schweinerotlauf-antikörper dagegen sollen nach *Emmerich* und *Tsuboi* nur in den Albuminen enthalten sein.

Nachdem dann *Atkinson* eine direkte Beziehung von Antitoxin- und Globulingehalt behauptet hatte, fanden *Joachim* und später *Ledingham* bei der Analyse des Serums vom Pferde im Verlauf der Immunisierung gegen Diphtherietoxin eine starke Zunahme des Gesamtglobulins auf Kosten der Albumine, wobei aber gerade die Euglobuline in erster Linie vermehrt waren, die doch Antitoxin nicht enthalten sollen. Da bei einem Pferde, dessen Globulingehalt von vornherien hoch war, ein höherer Antitoxingehalt nicht zu erzielen war, betrachtet *Ledingham* doch die Vermehrung der Globuline als Voraussetzung der Antitoxinbildung. Von den meisten Untersuchern wurde nur der „*Eiweißquotient*" (Proteinindex), d. i. das Verhältnis vom Gesamtserumglobulin zum Serumalbumin festgestellt. So fanden eine Zunahme desselben *Langstein* und *Mayer* bei Immunisierung von Kaninchen gegen Schweinerotlauf, Typhus, Pneumo- und Streptokokken, wogegen *P. Th. Müller*, der mit Staphylo- und Streptokokken sowie mit Typhus immunisierte, nur eine relative Vermehrung des Fibrinogens, also der noch vor den Euglobulinen aussalzbaren Eiweißfraktion beobachtete. *Glässner* dagegen, der auch eine Globulinvermehrung im Verlaufe der Immunisierung mit Typhus und Coli konstatierte, brachte dieselbe mit Stoffwechselstörungen in Zusammenhang, da sie bei vorsichtiger Immunisierung nicht aufzutreten braucht. *Moll* aber, der auch bei Tieren, die nur mit Präzipitinogen vorbehandelt waren, konstante Globulinvermehrung beobachtete, stellte daraufhin eine Beziehung zum Stoffwechsel in Abrede, ebenso *Robertson*, *Hansen* und *Mc. Quarrie* auf Grund der Ergebnisse refraktrometrischer Untersuchungen. *Thompson* und *Briggs* dagegen behaupten sogar ein Ansteigen der Albumine im Hungerzustande. Überdies stellte *Robertson*, der viele Sera verschiedener Tierarten untersuchte, hohe individuelle Schwankungen fest, und eben solche beobachteten *de Crinis* sowie *Alder* beim Menschen unter normalen und pathologischen Verhältnissen. *Schmidt-Skolfield* und *Schmidt* aber gelangten zur Ablehnung jedes Zusammenhanges von Immunkörperbildung und Zunahme der Globuline beim Kaninchen. Eine Komplikation erfuhr die Lösung dieser Frage durch die schon von *Porges* und *Spiro* erkannte Schwierigkeit, die einzelnen Fraktionen durch Aussalzen völlig zu isolieren, überdies durch die von *Moll* zuerst behauptete Umwandlung insbesondere der Albumine in Globuline, die durch Hitzeinaktivierung, Altern und ähnliche Einwirkungen herbeigeführt werden sollte. Während aber daraufhin *Hammarsten* die Benutzung der Fällbarkeitsgrenzen zur Trennung von Eiweißstoffen schlechthin ablehnt, wird von anderen Autoren doch die durch fraktionierte Aussalzung erfolgte Isolierung als hinreichend betrachtet (*Hardy* und *Gardener*, *Wiener*, *Haslam*, *Thomas* und *Lock*, *Heß*). Andererseits wurde die Deutung der *Moll*schen Befunde als Umwandlung, die nur *Starke* stützte, auf Grund der chemischen Verschiedenheit der „künstlichen" Albumine gegenüber natürlichen abgelehnt (*Gibson*, *Chick* und *Martin*, *Bywaters* und *Tasker*). Immerhin wurde die Verschiebbarkeit der Aussalzungsgrenzen allseits bestätigt, insbesondere unter dem Einfluß der Erwärmung, neuerdings von *Homer*, wie dies auch der kolloidchemischen Theorie der Aussalzung entspricht. (*Michaelis* und *Rona*, *Chick* und *Martin*.) *Chick* nimmt demgemäß

auch die Möglichkeit der Umwandlung speziell von Pseudoglobulin in Euglobulin an, *Reitstötter* aber gelangt sogar neuerdings zu der nicht einmal von *Moll* vertretenen Auffassung, daß die Albumine sich direkt in die Euglobuline umwandeln.

Begreiflicherweise hat man aber auch andere Methoden und Kriterien herangezogen, um die Eiweißfraktionen zu charakterisieren und den quantitativen Aufbau des Serumeiweißes festzustellen. Es hat sich herausgestellt, daß die durch Aussalzung trennbaren Eiweißfraktionen auch durch verschiedene chemisch-physikalische Kriterien wohl unterscheidbar sind, doch sind die auf solchen fußenden Methoden für die Bestimmung der quantitativen Verhältnisse mit Ausnahme der Refraktrometrie (*Robertson*) kaum verwendbar. Jedenfalls haben alle bisherigen Untersuchungen meist wohl infolge des zu geringen Untersuchungsmaterials zu endgültigen Entscheidungen nicht geführt. Wir glauben daher, daß eine systematische Verarbeitung des großen Materials, das uns bei der technischen Serumgewinnung und durch die hierbei geübte Konzentrierungsmethode (Elektroosmose) zur Verfügung stand, immerhin einigen Wert haben könnte. Trotz der kolloidchemischen Natur der Fragen und so erwünscht uns eine Nachprüfung der auffälligen Befunde *Reitstötters* mit dessen eigenen Methoden (Goldzahlbestimmung und Sensibilisierungswert für Ferrihydroxydsole) erschien, mußten wir zunächst von derlei Untersuchungsmethoden absehen, um durch Klarstellung der einfachen Mengenverhältnisse mittels der Gewichtsanalyse an einem möglichst großen und vielseitigen Material zu Resultaten zu kommen, die vielleicht eine praktische Nutzanwendung finden könnten.

Folgende Fragen sollten durch unsere Untersuchungen beantwortet werden:

1. Findet *gesetzmäßig* im Verlaufe der Immunisierung eine Veränderung der quantitativen Verhältnisse der durch bestimmte Aussalzungsgrenzen charakterisierten Eiweißfraktionen, insbesondere des Globulin-Albuminverhältnisses im Serum statt?

2. Steht diese Veränderung in unmittelbarem ursächlichen Zusammenhang mit der Antikörperbildung?

3. Inwieweit ist die Veränderung abhängig von der untersuchten Tierart und der Art der Immunisierung?

4. Ist die Zugehörigkeit der Antikörper zu bestimmten Fraktionen konstant bzw. verschiebt sich mit den Aussalzungsgrenzen der einzelnen Fraktionen, d. h. der scheinbaren Umwandlung von schwerer fällbarem Eiweiß in leichter fällbares unter dem Einfluß physikalischer Faktoren (Altern) auch die Fällbarkeit der Antikörper?

Über unsere Methodik ist wenig zu sagen. In den systematischen Versuchen haben wir Gewicht darauf gelegt, die einzelnen Fraktionen hintereinander aus derselben Serumlösung auszufällen. Wir verdünnten zunächst das Serum zu gleichen Teilen mit Wasser und setzten einen Teil gesättigter Ammonsulfatlösung zu. Die bei dieser Drittelsättigung

ausfallende Fraktion (Euglobuline) wurde klar abfiltriert. Aus dem Filtrat (F. I) wurde durch Zusatz von weiterer Ammonsulfatlösung im Verhältnis 1 : 3 Filtrat (Halbsättigung) die zweite Eiweißfraktion (Pseudoglobuline) ausgesalzen und wieder klar abfiltriert. Das übrigbleibende Filtrat (F. II) enthielt dann nur mehr „Albumine". In gemessenen Mengen des halbverdünnten Serums, des Filtrats I und des Filtrats II wurde der Eiweißgehalt nach 24stündigem Kochen der stark verdünnten, angesäuerten und mit Salzzusatz versetzten Proben bestimmt. Zur Kontrolle wurden stets zwei Proben ausgeführt, in einer ganzen Reihe von Fällen aber die ganze Bestimmung wiederholt, wobei sich mit ganz wenigen Ausnahmefällen, die wir ausschieden, gute Übereinstimmung ergab. Bei einem großen Teil der Versuche wurde die Trocknung nur im Brutschrank (24 Stunden bei etwa 40°) durchgeführt, doch weichen die so gewonnenen Resultate von den unter Trocknung im Heißluftschrank erhaltenen nur unwesentlich ab. Die Berechnung der einzelnen Fraktionen erfolgte dann in der Weise, daß als Euglobuline in 1 ccm Serum die Differenz des Eiweißgehaltes von 2 ccm halbverdünnten Serums (Gesamteiweißgehalt) weniger dem Eiweißgehalt von 3 ccm F. I, als Pseudoglobuline in 1 ccm Serum die Differenz des Eiweißgehaltes von 3 ccm F. I weniger dem Eiweißgehalt von 4 ccm F. II, und als Albumin in 1 ccm Serum eben der Eiweißgehalt von 4 ccm F. II galten.

Indem wir hierbei die von *Fuld* und *Spiro* aufgestellten Aussalzungsgrenzen annahmen, waren wir uns bewußt, daß die von uns als Euglobulin und Pseudoglobulin bezeichneten Fraktionen nicht völlig mit den Begriffen „wasserunlösliches" und „wasserlösliches" Globulin zusammenfallen (*Freund* und *Joachim*), obwohl die letzteren der bei uns üblichen Konzentrierungsmethode (Elektroosmose) zugrunde liegen. Aber es schien uns nicht nur technisch einfacher, sondern auch richtiger, die Fraktionierung nach einem einheitlichen Prinzip, eben dem der stufenweisen Aussalzung, durchzuführen. Auch galten unsere Feststellungen hauptsächlich dem Verhältnis Gesamtglobulin zu Albumin, dem sogenannten *Eiweißquotienten*. Ausschließlich dessen Werte konnten wir auch aus jenem Teile unseres Materials gewinnen, das unseren fortlaufenden Bestimmungen bei der technischen Serumkonzentrierung entstammt, da hier nur Gesamteiweiße und Albumine bzw. aus der Differenz der beiden ersteren Größen die Gesamtglobuline bestimmt wurden.

I.

Da eine vergleichende Bestimmung der unter Wiederholung des ganzen Versuches gewonnenen Werte bei sechs gleich alten Seris von normalen Pferden gezeigt hatte, daß für das einzelne Serum Schwankungen bis zu 10 Proz. der gefundenen Größen innerhalb der unvermeidbaren Fehler-

grenzen liegen, während die Durchschnittswerte der sechs Proben beider Reihen nur mehr um 3 Proz. differierten, war es klar, daß entscheidende Resultate nicht allein auf der fortlaufenden Bestimmung verschiedener Aderlässe eines Tieres, sondern besser auf den Durchschnittswerten möglichst großer Reihen analoger Sera basiert werden könnten. Demgemäß wurde zunächst eine Anzahl normaler Pferdesera untersucht, und gibt Tabelle I eine Zusammenfassung der erhaltenen Werte.

Tabelle I.

	Alle 27 Normal-Pferdesera			davon 17 „frische" Sera			und 10 „alte" Sera		
	Durchschnitt	Maximum	Minimum	Durchschnitt	Maximum	Minimum	Durchschnitt	Maximum	Minimum
Gesamteiweiß pro ccm Serum	0,0714	0,0865	0,057	0,068	0,0853	0,057	0,077	0,0865	0,0661
Pseudoglobulin pro ccm Serum	0,0256	0,037	0,015	0,0221	0,0318	0,015	0,0315	0,037	0,0188
Albumin pro ccm Serum	0,0338	0,0416	0,0234	0,0357	0,0416	0,0235	0,0306	0,0403	0,0234
Proz. Pseudoglobulin	35,9	47,6	26,3	32,5	44,0	26,3	41,0	47,6	30,0
Proz. Albumin	47,3	59,3	30,2	52,5	59,3	37,6	39,6	48,7	30,2
Eiweißquotient	1,11	2,31	0,69	0,9	1,82	0,69	1,52	2,31	1,05

Zunächst fallen die enormen Differenzen zwischen Maximal- und Minimalwerten, die jeweils vorkamen, auf. Sie übersteigen bei weitem die durchschnittlichen Unterschiede der Durchschnittswerte verschiedener Kategorien von Serum, die wir weiterhin noch kennen lernen werden. Andererseits aber gehen sie jedenfalls um ein Vielfaches über die unserem Verfahren anhaftende Fehlergrenze hinaus, sind also zweifellos wirkliche Unterschiede der betreffenden Sera. Dies wird übrigens durch Übereinstimmung wiederholter Bestimmungen der gleichen Sera bewiesen. Es ergaben sich ferner als Grundlagen unserer weiteren Untersuchungen ein Durchschnittswert an Gesamteiweiß von 7,14 Proz. und ein Eiweißquotient von 1,1, bzw. wenn man aus den noch zu besprechenden Gründen nur die frischen Sera heranzieht, 6,8 Proz. Eiweißgehalt und 0,9 Eiweißquotient. Zwischen „frischen", d. h. weniger als 6 Monate aufbewahrten und „alten", d. h. mehr als 3 Jahre gelagerten Seris zeigt sich nämlich der von *Moll* schon beschriebene charakteristische Unterschied im Aufbau. Die als Albumine bezeichneten, bei Halbsättigung nicht fällbaren Eiweißkörper nehmen mit zunehmendem Alter der Sera merklich ab, der Eiweißquotient steigt von 0,9 auf 1,52, entsprechend der Steigerung beider leichter fällbaren Fraktionen. Während die Euglobuline hierbei von 15 auf 19,4 Proz. steigen, nehmen auch die Pseudoglobuline von 32,5 auf 41 Proz. zu. Es können daher nicht gut gerade erstere die Umwandlungsprodukte der Albumine sein, wie *Reitstötter* angibt.

Stellen wir diesen Zahlen die in analoger Weise bei einer großen Anzahl von Diphtheriepferdeseren bestimmten Werte gegenüber, die Tabelle II wiedergibt, so können wir folgendes konstatieren.

Tabelle II.

	Alle 77 Diphtheriepferdesera			davon 63 „frische" Sera			und 14 „alte" Sera		
	Durchschnitt	Maximum	Minimum	Durchschnitt	Maximum	Minimum	Durchschnitt	Maximum	Minimum
Gesamteiweiß pro ccm Serum	0,0901	0,1166	0,0709	0,0899	0,1166	0,0709	0,0908	0,1079	0,791
Pseudoglobulin pro ccm Serum	0,0475	0,0716	0,0294	0,0456	0,0628	0,0294	0,0561	0,0716	0,0408
Albumin pro ccm Serum	0,0250	0,0360	0,0267	0,0261	0,0338	0,0167	0,0200	0,0360	0,0067
Proz. Pseudoglobulin	52,7	76,8	35,8	50,7	63,4	35,8	61,8	76,8	46,5
Proz. Albumin	27,7	41,0	8,2	29,0	40,1	20,1	22,0	41,0	8,2
Eiweißquotient	2,61	11,2	1,44	2,45	3,97	1,49	3,54	11,2	1,44

Trotz der auch hier überaus großen individuellen Schwankungen und des auch hier hervortretenden Unterschiedes zwischen „frischen" und „alten" Seris sind charakteristische Abweichungen von den Normalwerten unverkennbar. Die Durchschnittszahlen für Gesamteiweiß wie für Pseudoglobulin sind deutlich höher als bei den Normalseris, die für Albumin dagegen niedriger. Natürlich sind auch die Prozentanteile des Pseudoglobulins wesentlich größer, die des Albumins kleiner als in Tabelle I, und dementsprechend ist endlich der Eiweißquotient etwa zweieinhalbmal so groß als bei den normalen Seris. *Es findet also zweifellos im Verlauf mindestens der antitoxischen Diphtherieimmunisierung eine gesetzmäßige Verschiebung im Eiweißaufbau der Pferdesera statt*, wobei es zu einer vermehrten Bildung leichter fällbarer Eiweißanteile (Globuline) wahrscheinlich unter teilweiser Umwandlung der schwerer fällbaren (Albumine) in solche kommt. Es ist aber keineswegs richtig, wie *Joachim* sowie *Ledingham* angeben, daß die Verschiebung hauptsächlich zugunsten der „unwirksamen" Euglobuline stattfindet. Diese steigen vielmehr nur recht unwesentlich, nämlich von 16,8 Proz. bzw. 15 Proz. (bei frischen allein) auf 19,6 Proz. bzw. 20,3 Proz., in vielen Einzelfällen aber gar nicht. Der Hauptanteil der Globulinzunahme dagegen entfällt auf die Pseudoglobuline, die im Diphtherieserum durchschnittlich allein mehr als die Hälfte des Eiweißgehaltes ausmachen.

Die *Gesetzmäßigkeit* dieser Veränderungen wird noch augenfälliger, wenn man Werte *derselben Sera* vor und im Verlauf der Immunisierung einander gegenüberstellt (Tab. III).

Die Zunahme des Gesamteiweißgehaltes, die absolute und relative Vermehrung der Globuline, die entsprechende Verminderung der Albumine, die mehrfache Steigerung des Eiweißquotienten fehlen in keinem einzigen Falle, nur das Ausmaß dieser Abweichungen zeigt starke individuelle Unterschiede. Das Verhalten der Euglobulinfraktion ist ganz unregelmäßig. Es muß aber festgehalten werden, daß alle gefundenen Werte an sich keineswegs charakteristisch für antitoxisches Diphtheriepferdeserum sind, da auch bei Normalseris Maximal- bzw. Minimalwerte vorkommen, die den bei Diphtherieseris meist gefundenen gleichkommen. Schon dies scheint uns sehr dagegen zu sprechen, in jenen Veränderungen, obwohl sie sich regelmäßig im Verlauf der Immunisierung einstellen, etwa einen Ausdruck oder gar die Voraussetzung der Antikörperbildung sehen zu wollen, wie *Ledingham* meinte.

Tabelle III.

Pferd	Aderlaß vom	Prüfung vom	Immunisierung	pro ccm Serum				Prozent			Eiweiß-quotient	Anmerkung
				Gesamteiweiß	Euglobuline	Pseudoglobuline	Albumin	Euglobuline	Pseudoglobuline	Albumin		
Corvette	30. IX. 20	4. XII. 20	normal	0,0853	0,0119	0,0318	0,0416	14,0	37,3	48,7	1,05	
	15. XII. 20	23. XII. 20	Diphtherie I	0,0968	0,0190	0,0536	0,0242	19,6	55,4	25,0	3,0	< 100fach
Citrone	30. IX. 20	17. XII. 20	normal	0,0733	0,0188	0,0244	0,0351	18,8	33,2	48,0	1,08	
	15. XII. 20	23. XII 20	Diphtherie I	0,0813	0,0147	0,0405	0,0261	18,1	49,7	32,2	2,1	< 150fach
Cyrill	30. IX. 20	17. XII. 20	normal	0,0702	0,0068	0,0218	0,0416	9,6	31,1	59,3	0,69	
	15. XII. 20	27. XII. 20	Diphtherie I	0,0947	0,0130	0,0547	0,0270	13,6	57,8	28,6	2,5	< 150fach
Cyniker	30. IX. 20	20. XII. 20	normal	0,0674	0,0055	0,0220	0,0399	8,1	32,8	59,1	0,69	
	15. XII. 20	27. XII. 20	Diphtherie I	0,0975	0,0108	0,0566	0,0301	11,1	58,0	30,9	2,24	< 150fach
Centaur	30. IX. 20	20. XII. 20	normal	0,0713	0,0060	0,0246	0,0407	8,4	34,5	57,1	0,75	
	15. XII. 20	27. XII. 20	Diphtherie I	0,0742	0,0095	0,0397	0,0250	12,8	53,4	33,8	1,96	250fach
Coriolan	30. IX. 20	21. XII. 20	normal	0,0757	0,0081	0,0234	0,0442	10,7	30,9	58,4	0,71	
	15. XII. 20	21. XII. 20	Diphtherie I	0,0910	0,0072	0,0528	0,0310	7,9	58,0	34,1	1,93	< 150fach
Despot	20. IX. 21	21. XII. 21	normal	0,069	0,015	0,021	0,033	21,8	30,4	47,8	1,09	
	7. XII. 21	19. I. 22	Diphtherie I	0,091	0,024	0,046	0,021	26,4	50,5	23,1	3,33	> 500fach
Dollar	20. IX. 21	27. XII. 21	normal	0,057	0,014	0,015	0,028	24,6	26,3	49,1	1,04	
	7. XII. 21	19. I. 22	Diphtherie I	0,093	0,012	0,059	0,022	12,9	63,4	23,7	3,22	450fach
Dichter	20. IX. 21	2. I. 22	normal	0,063	0,006	0,023	0,034	9,5	36,5	54,0	0,85	
	7. XII. 21	29. XII. 22	Diphtherie I	0,085	0,025	0,038	0,022	29,4	44,7	25,9	2,86	< 150fach
Dame	20. IX. 21	2. I. 22	normal	0,071	0,016	0,021	0,034	22,5	29,6	47,9	1,09	
	7. XII 21	29. XII. 22	Diphtherie I	0,092	0,021	0,050	0,021	22,8	54,4	22,8	3,39	< 200fach
David	20. IX. 21	13. I. 22	normal	0,070	0,012	0,019	0,039	17,1	27,1	55,8	0,79	
	7. XII. 21	31. XII. 22	Diphtherie I	0,082	0,0095	0,046	0,026	12,2	56,1	31,7	2,15	< 150fach
Dieb	20 IX. 21	14. I. 22	normal	0,068	0,008	0,022	0,038	11,8	32,3	55,9	0,79	Durchschnitt von 2 Bestimmungen 150fach
	18. I. 22	30. I. 22	Diphtherie II	0,083	·0,022	0,036	0,025	26,5	43,4	30,1	2,32	
		u. 3. II. 22		—	—	—	—	—	—	—	—	

Für diesen Zusammenhang müßte sich aber, wenn er bestände, unschwer ein *direkter Nachweis durch Vergleich der bei Diphtherieseris von verschiedenem Antitoxingehalt eintretenden Verschiebungen* im Eiweißaufbau erbringen lassen. Betrachtet man daraufhin die Resultate der Tabelle III, so könnte zunächst der Eindruck entstehen, daß hochwertige Sera sich tatsächlich durch höhere Eiweißquotienten auszeichnen. Es muß aber gleich hervorgehoben werden, daß die beiden hochwertigen Pferde dieser Serie (Despot und Dollar) auch schon vor der Immunisierung höhere Eiweißquotienten aufwiesen, als die meisten übrigen Pferde. Das relative Verhältnis der Eiweißquotienten vor und nach der Immunisierung, also der unmittelbare Ausdruck der Verschiebung der Fraktionen, ist bei allen Pferden annähernd gleich. Demgemäß zeigen auch zwei zunächst noch minderwertige Pferde, die auch normal höhere Eiweißquotienten hatten (Corvette und Dame), nach der Immunisierung ebenso hohe Zahlen wie die beiden hochwertigen.

Um aber zu einem besser begründeten Urteil in dieser entscheidenden Frage zu gelangen, blieb noch der Weg der Durchschnittszahl großer gleichartiger Reihen. In Tabelle IV sind daher die entsprechenden Zahlen der in drei Gruppen je nach ihrer Wertigkeit eingereihten Diphtheriesera zusammengestellt, wobei aber nur „frische“ Sera einbezogen wurden.

Tabelle IV.

	Hochwert. Sera (> 400fach)			Mittelwert. Sera (> 250fach)			minderwert. Sera (< 250fach)		
	Anzahl der Sera: 16			22			23		
	Durchschnitt	Maximum	Minimum	Durchschnitt	Maximum	Minimum	Durchschnitt	Maximum	Minimum
Gesamteiweiß	0,0883	0,1085	0,0717	0,0938	0,1166	0,0780	0,0889	0,1050	0,0709
Pseudoglobulin pro ccm Serum	0,0430	0,0590	0,0294	0,0480	0,0628	0,0390	0,0450	0,0566	0,0346
Albumin pro ccm Serum	0,0267	0,0332	0,0167	0,0252	0,0338	0,0189	0,0264	0,0320	0,0200
Proz. Pseudoglobulin	48,7	63,4	35,8	51,6	60,2	42,4	50,6	62,3	39,1
Proz. Albumin	30,2	40,0	23,1	26,9	35,2	20,1	29,7	40,1	20,1
Eiweißquotient	2,31	3,33	1,5	2,72	3,97	1,84	2,37	3,97	1,49

Die entsprechenden Werte der drei Gruppen stimmen in Anbetracht der großen individuellen Unterschiede doch auffallend gut überein. Es ergibt sich keinerlei gesetzmäßiges Verhalten entsprechend der Wertigkeit, die am meisten von den Normalwerten abweichenden Zahlen finden sich (wohl zufällig) in der Gruppe der mittelwertigen Sera. *Die auch von uns nachgewiesenen Veränderungen im Eiweißaufbau antitoxischer Diphtheriesera können also keinesfalls der Ausdruck oder die Vorbedingung der Antitoxinbildung sein.*

Immerhin bliebe zu untersuchen, ob die oben erwähnten hohen Eiweißquotienten bei Pferden, die später hochwertig wurden, nur Zufallsbefunde waren, oder ob etwa ein Zusammenhang zwischen Eiweißaufbau und Antitoxinbildung in der Richtung besteht, daß hohe Eiweißquotienten bei normalen Pferden irgendwie eine Disposition zu guter Antitoxinbildung

kennzeichnen. Unser in dieser Richtung freilich unzureichendes Material spricht einigermaßen für diese Annahme, die allerdings gerade im Gegensatz zu der Auffassung *Ledinghams* steht. Von 26 daraufhin beobachteten Pferden wiesen nämlich 12, die überdurchschnittlichen Eiweißquotienten vor der Immunisierung hatten, einen durchschnittlichen Antitoxinwert von 380 Antitoxineinheiten auf, während die 14 unterdurchschnittlichen nur 260 Antitoxineinheiten erreichten. Auch wurden alle Pferde mit auffallend hohen Quotienten vor der Immunisierung mehr oder weniger hochwertig.

Nun tritt aber, wie schon oben festgestellt, jene Verschiebung der Fällbarkeit im Verlauf der antitoxischen Diphtherieimmunisierung *regelmäßig* ein. Es lag daher nahe, sie wenigstens als eine *Reaktion auf die Toxinbehandlung* aufzufassen. Dann müßte aber das Ausmaß der Verschiebung irgendwie von Dauer oder Intensität der Behandlung mit Toxin abhängig sein. In Tabelle V sind daher Gruppen zusammengefaßt, die durch die vorausgegangene Dauer der Immunisierung, gekennzeichnet durch die Zahl der erfolgten Aderlässe, abgegrenzt sind, wobei nur die Durchschnittzahlen und nur „frische" Sera in Betracht gezogen sind.

Tabelle V.

	Anzahl der Sera	Gesamteiweiß pro ccm Serum	Pseudoglobulin pro ccm Serum	Albumin pro ccm Serum	Pseudoglobulin Proz.	Albumin Proz.	Eiweißquotient
1. Diphtherieaderlaß	22	0,0881	0,0466	0,0274	52,9	31,1	2,22
2. Diphtherieaderlaß	13	0,0873	0,0414	0,0277	47,4	31,7	2,15
3. Diphtherieaderlaß	6	0,0871	0,0435	0,0284	50,0	32,6	2,07
Spätere Diphtherieaderlässe	20	0,0951	0,0482	0,0251	50,7	26,4	2,8
Alle 61 Diphtheriesera	61	0,0903	0,0457	0,0268	50,6	29,7	2,37

Das Ergebnis scheint allerdings im Sinne eines Einflusses der Dauer der Vorbehandlung auf das Ausmaß der Veränderungen im Eiweißaufbau zu sprechen. Die entscheidende Verschiebung erfolgt aber schon vor dem ersten Diphtherieaderlaß (nach etwa 3 Monaten Immunisierung), denn zwischen diesem und den in den nächsten drei Monaten folgenden zweiten und dritten Aderlässen ist überhaupt kein Unterschied erkennbar. Die Gruppe der späteren Aderlässe aber, in welche vorwiegend Pferde mit mehrjähriger Immunisierung fallen, zeigt immerhin ganz deutlich ein weiteres Fortschreiten jenes Umwandlungsprozesses: Wir konstatieren weiter erhöhten Gesamteiweißgehalt, weiteres Sinken der absoluten und relativen Menge der Albumine und demgemäß als sinnfälligsten Ausdruck starkes Ansteigen des Eiweißquotienten. Hierbei erfahren aber nicht mehr die Pseudoglobuline eine prozentuale Steigerung wie in der Anfangsimmunisierung, sondern die Verschiebung erfolgt nunmehr tatsächlich vor allem zugunsten der Euglobuline, die bei späteren Aderlässen 22,9 Proz. gegen 16 Proz. beim ersten Diphtherieaderlaß und 15 Proz. bei Normalseris ausmachen. Es scheint uns beachtenswert, daß dieser späteren Änderung im Eiweißaufbau kein weiteres Ansteigen der Antitoxine entspricht, da mindestens bei unserer Technik der Immunisierung der Höhepunkt des Titers meist im ersten Halbjahr, immer aber im ersten Jahre der Behandlung liegt, worauf regel-

mäßig ein Abfall der Antitoxinkurve eintritt. Das gleichzeitige Ansteigen der Antitoxine und der mit ihnen eng verbundenen Pseudoglobuline im Beginn der Immunisierung im Gegensatz zu der späteren Zunahme der unwirksamen Euglobuline bei gleichbleibenden oder abnehmenden Antitoxinen ist immerhin auffällig. Doch scheint uns eine grundsätzliche Unterscheidung zweier Wandlungsprozesse im Eiweißaufbau nicht ohne weiteres zulässig, da es sich viel eher nur um zwei Stufen eines einheitlichen Vorganges, der Umwandlung aller Eiweißkörper im Sinne leichterer Fällbarkeit handeln dürfte.

Es war andererseits die Abhängigkeit jener Eiweißveränderungen von der *Intensität der antitoxischen Diphtherieimmunisierungen* zu prüfen, wofür auch der mehrfach behauptete Einfluß des Fiebers auf den Eiweißaufbau spräche (*Doerr* und *Berger*, *Reitstötter*). Eine Reihe von Einzelbeobachtungen im Verlaufe unserer Untersuchungen machen einen solchen Einfluß stärkerer Fieberreaktionen in der Richtung einer starken Verminderung der Albumine wahrscheinlich. Es entsprachen auffallend niedrige Albuminwerte bei mehrfach geprüften Pferden stets Perioden, in denen starke Reaktionen vorgekommen waren, doch haben wir niemals (auch bei anderer Immunisierung) Sera beobachtet, die von Albuminen völlig frei waren, wie *Reitstötter* berichtet. Als Maß der Intensität der Immunisierung versuchten wir die durchschnittlich auf eine Woche der vorangehenden Aderlaßperiode entfallende Toxinmenge einzusetzen, wobei wir vor dem ersten Aderlaß die ganze Zeit von Beginn der Immunisierung an, in den späteren Perioden die Zeit vom letzten Aderlaß an rechnen. In der folgenden Tabelle VI sind die Durchschnittswerte nach diesem Gesichtspunkte abgegrenzter Gruppen der frischen Diphtheriesera zusammengestellt.

Tabelle VI.

Pro Woche injizierte Toxinmenge	Anzahl der Sera	Gesamteiweiß pro ccm Serum	Pseudoglobulin pro ccm Serum	Albumin pro ccm Serum	Pseudoglobulin Proz.	Albumin Proz.	Eiweißquotient
Bis 200 ccm . .	19	0,0895	0,0452	0,0253	50,6	28,6	2,5
> 200, < 280 ccm	25	0,0914	0,0456	0,0272	49,9	29,9	2,34
> 280 ccm . .	14	0,0880	0,0432	0,0274	49,1	30,6	2,27

Das Ergebnis ist ein durchaus negatives, die Übereinstimmung der drei Gruppen, die wir gebildet, so vollkommen als nur möglich, und keinesfalls zeigt sich bei den mit höheren Toxindosen behandelten Pferden ein stärkeres Abweichen von den Durchschnittswerten. Die Veränderungen im Eiweißaufbau scheinen also mindestens nicht direkt von den einverleibten Toxinmengen abhängig zu sein. Vielleicht tritt allerdings die Abhängigkeit der Eiweißveränderungen von den Injektionsmengen nur infolge der üblichen Immunisierungstechnik nicht zutage, da diese die Dosierung nach den Reaktionen reguliert, so daß höhere Durchschnittsdosen bei unseren Pferden nicht eigentlich intensivere Behandlung, sondern nur die der größeren Gifttoleranz der betreffenden Pferde entsprechende anzeigen.

Bezüglich des Fiebers aber sei erwähnt, daß von den zehn Pferden, die beim ersten Diphtherieaderlaß noch Albuminwerte über 30 Proz., also niedere Eiweißquotienten zeigten, sechs niemals Temperaturen über 39°, nur zwei solche über 39,5° durchgemacht hatten, dagegen von elf Pferden

mit hohen Eiweißquotienten, bei welchem also die Verschiebung schon deutlicher ausgesprochen war, jedes Tier mindestens die Temperatur von 39°, sechs Tiere aber Temperaturen über 39,5°, und zwar meist wiederholt erreicht hatten. Doch muß beachtet werden, daß jene Eiweißveränderungen im Verlauf der Immunisierung ausnahmslos, also auch bei solchen Pferden auftreten, die niemals nachweisbare Fieberreaktionen durchgemacht haben. (Centaur in Tabelle III zeigte eine Maximaltemperatur von 38,5°.) Es geht daher nicht an, jene Veränderung ausschließlich als Fieberfolge aufzufassen. Das Fieber dürfte vielmehr nur die Rolle eines begünstigenden Faktors haben, daneben müssen aber noch andere im Verlauf der Immunisierung regelmäßig vorkommende Reaktionen ursächliche Bedeutung haben.

II.

Hatten wir gewisse Veränderungen im Aufbau des Serumeiweißes, die wir vielleicht einheitlich als erhöhte Aussalzungsfähigkeit, also Labilität kennzeichnen dürfen, als gesetzmäßige Reaktion bei der antitoxischen Diphtherieimmunisierung nachgewiesen, so lag es nahe, auf analoge Erscheinungen im Verlaufe anderer Immunisierungen, sowie bei anderen Tierarten zu prüfen. Allerdings stand uns in dieser Richtung nur ein recht beschränktes Material zur Verfügung, da von jeder einzelnen Kategorie nur wenige Tiere für die Untersuchung in Betracht kamen. Es ließ sich auch nicht vermeiden, zum großen Teil „alte" Sera heranzuziehen, da „frische" der betreffenden Art überhaupt nicht vorhanden waren. Eine besondere Schwierigkeit aber entstand durch den bei uns üblichen Wechsel der Immunisierung, da die meisten andersartigen Immunpferde vorher längere Zeit zur Diphtherieimmunisierung verwendet worden waren. Allerdings erscheinen unsere Feststellungen gerade unter diesem Gesichtspunkte noch auffallender. In der folgenden Tabelle VII sind zunächst die bei den einzelnen Immunisierungsarten gefundenen Durchschnittswerte ohne Rücksicht auf das Alter der Sera den bei Normalpferden einerseits, bei Diphtheriepferden andererseits erhaltenen gegenübergestellt.

Tabelle VII.

Serumart	Normal	Cholera (agglutinierend)	Meningokokken (bakteriotrop)	Dysenterie (antitox.)	Gasbrand (antitox.)	Tetanus (antitox.)	Diphtherie (antitox.)
Anzahl der Sera .	27 (17 + 10)*	5 (1 + 4)	1 (1 + 0)	14 (8 + 6)	2 (2 + 0)	9 (3 + 6)	77 (63+14)
Gesamteiweiß pro ccm Serum	0,0714	0,0786	0,0640	0,0825	0,0730	0,0786	0,0901
Pseudoglobulin pro ccm Serum	0,0256	0,0330	0,0280	0,0399	0,0285	0,0362	0,0475
Albumin pro ccm Serum	0,0338	0,0298	0,0210	0,0301	0,0300	0,0310	0,0250
Proz. Pseudoglobulin	35,9	42,0	41,0	48,4	39,7	41,7	52,7
Proz. Albumin	47,3	37,9	32,8	36,5	41,1	39,6	27,7
Eiweißquotient	1,11	1,64	2,11	1,74	1,43	1,52	2,61

*) Die Zahlen in Klammern geben an, wieviel „frische" bzw. „alte" Sera unter den untersuchten waren.

Trotz der großen Schwankungen waren bei den normalen, wie bei den Diphtherieseren schon die Durchschnitte relativ kleiner Serumgruppen recht konstant und charakteristisch, es müßte daher auch in den hier be-

rechneten Durchschnittszahlen, die immerhin Gruppen von 9 und 14 Seren umfassen, die eventuellen charakteristischen Merkmale der betreffenden Gattung sich schon deutlich geltend machen. Auch sind die Resultate so augenfällige, daß man ihnen trotz des geringen Materials einige Beweiskraft wird zusprechen müssen. Alle untersuchten Serumarten geben nämlich Durchschnittswerte, die zwar teilweise deutlich von den Normalzahlen, und zwar im gleichen Sinne wie bei Diphtherieseris abweichen, aber bei keiner, und zwar auch nicht im einzelnen, im entferntesten das bei diesen konstatierte Ausmaß erreichen. Man könnte daher annehmen, daß bei anderen Immunisierungen gleichsinnige, wenn auch geringfügigere Veränderungen wie bei der antitoxischen Diphtherieimmunität stattfinden, doch scheinen uns dagegen die Resultate jener kleinen Serumgruppen zu sprechen, deren Glieder vorher nicht mit Diphtherietoxin behandelt worden waren. Da es sich hierbei ausschließlich um „alte" Sera handelt, bei denen an sich eine gewisse Verschiebung vorauszusetzen war, müssen ihnen zum Vergleich auch nur die Werte der „alten" Sera von normalen und Diphtheriepferden gegenübergestellt werden.

Bei diesem Vergleiche (Tabelle VIII) zeigen sich so geringe Unterschiede der anderen Immunsera gegenüber den normalen Seren, daß sie wohl in den Rahmen der zufälligen Differenzen fallen. Höchstens die Dysenteriesera zeigen eine etwas deutlicher ausgeprägte Abweichung im Sinne der Diphtherie, also vermehrten Eiweißgehalt, vermehrte Pseudoglobuline, etwas erhöhten Eiweißquotienten. Im ganzen aber sind diese überdies zumeist hochwertigen Immunsera im Eiweißaufbau von Normalseren gleichen Alters nicht verschieden. Es kann also auch bei diesen Immunisierungen eine Eiweißveränderung absolut nicht die Voraussetzung des Gehaltes an Immunkörpern sein. Daß demgegenüber manche der untersuchten Immunsera stärkere Veränderungen aufweisen, kann nicht wundernehmen, da es sich hierbei, wie erwähnt, um Sera ehemaliger Diphtheriepferde handelt; es ist vielmehr erstaunlich, wie rasch und vollkommen in mehreren Fällen die vorher zweifellos bestandenen starken Veränderungen schon wieder ausgeglichen waren. Um so auffallender sind danach die Angaben *Reitstötters*, der außer Schweinerotlauf und Geflügelcholeraseren, über die wir mangels Materials nichts aussagen können, auch Tetanus- und Dysenteriesera gefunden haben will, die überhaupt keine Albumine enthielten. Es ist nicht ersichtlich, wie oft *Reitstötter* solche ungewöhnlichen Befunde erhob, keinesfalls haben sie, wie unsere Ergebnisse beweisen, irgend etwas mit der betreffenden Immunisierungsart zu tun, und müssen wir auch die von *Reitstötter* gegebene Erklärung als Fieberwirkung auf Grund der oben angeführten Resultate bei stark fiebernden Diphtheriepferden mindestens für unzureichend halten.

Tabelle VIII.

Serumart	Anzahl der Sera	Gesamteiweiß pro ccm Serum	Pseudoglobulin pro ccm Serum	Albumin pro ccm Serum	Pseudoglobulin Proz.	Albumin Proz.	Eiweißquotient
Normal	10	0,0770	0,0315	0,0306	41,0	39,6	1,52
Cholera	4	0,0790	0,0342	0,0292	43,5	36,7	1,73
Dysenterie . .	6	0,0869	0,0427	0,0311	49,1	35,8	1,79
Tetanus . . .	6	0,0804	0,0386	0,0303	48,3	37,6	1,66
Diphtherie . .	14	0,0908	0,0561	0,0200	61,8	22,0	3,54

Die bisherigen Untersuchungen betrafen nur Pferdesera. Es schien uns aber zur weiteren Klärung der Frage über die Bedeutung der im Verlauf der antitoxischen Diphtherieimmunisierung auftretenden Eiweißveränderung noch von Interesse, die analogen Verhältnisse bei *anderen Tierarten* zu verfolgen. Zunächst sollten die Normalwerte bei den für Immunisierungszwecke am häufigsten verwendeten Arten bestimmt werden, wobei wir natürlich auch auf ein wesentlich kleineres Material beschränkt waren als bei den Pferden. Da aber bei den hier untersuchten Arten merkwürdigerweise nicht so starke Differenzen zwischen den einzelnen Individuen zu beobachten waren, dürften doch schon die Durchschnitte kleinerer Gruppen annähernd richtige Werte ergeben haben, zumal durchaus nur „frische" Sera geprüft wurden.

Tabelle IX.

Tiergattung	Anzahl der Sera	Gesamteiweiß pro ccm Serum	Pseudoglobulin pro ccm Serum	Albumin pro ccm Serum	Pseudoglobulin Proz.	Albumin Proz.	Eiweißquotient
Pferd	17	0,0680	0,0221	0,0357	32,5	52,5	0,9
Rind	2	0,0695	0,0187	0,0348	27,2	50,7	0,97
Schaf	3	0,0533	0,0103	0,0297	19,4	55,8	0,79
Ziege	6	0,0703	0,0138	0,0377	19,8	53,7	0,86
Schwein . . .	3	0,0630	0,0187	0,0203	29,5	38,0	1,63
Kaninchen . .	4	0,0605	0,0097	0,0447	16,1	74,0	0,35
Meerschweinchen .	6	0,0480	0,0192	0,0245	40,1	51,0	0,96

Bei einem Vergleich der verschiedenen Tierarten (Tabelle IX) fällt am meisten das stark abweichende Verhalten vom Schwein einerseits, Kaninchen andererseits auf, das sich am sinnfälligsten in den Ziffern der Eiweißquotienten spiegelt. Darnach ist das Schweineserum das an leicht aussalzbaren Eiweißkörpern weitaus reichste, das Kaninchenserum das an solchen weitaus ärmste. Wenn die Fähigkeit der Antitoxinbildung von der mehr oder weniger labilen Konstitution des Serumeiweißes irgendwie abhängt, wäre somit ein gegensätzliches Verhalten beider Gattungen bei der Antitoxinbildung zu erwarten. Unseres Wissens wurde bisher ein solches nicht konstatiert, während andererseits die schlecht Antitoxin bildenden Meerschweinchen in ihrem Eiweißaufbau keine besonders ausgeprägte Eigenheit zeigen. Auch das Rind, das nach unseren eigenen Erfahrungen ein viel schlechterer Antitoxinbildner ist als das Pferd, besitzt trotzdem eine sehr weitgehende Ähnlichkeit der Eiweißkonstitution. Hervorgehoben sei noch die Übereinstimmung der Werte von Schaf und Ziege, deren charakteristisches Merkmal das Überwiegen der Euglobuline über die Pseudoglobuline zu sein scheint, womit vielleicht die eingangs zitierten Angaben *E. P. Picks* über die verschiedene Verteilung der Antitoxine auf die Globulinfraktionen bei Pferd und Ziege eine einfache Erklärung finden.

Wir hatten auch Gelegenheit, das Verhalten von Rindern bei der Diphtherieimmunisierung direkt zu verfolgen. In der folgenden Tabelle (Tabelle X) geben wir die Resultate der einzelnen untersuchten Sera nebst den Durchschnittszahlen wieder.

Es ergibt sich die überraschende Feststellung, daß eine deutliche Verschiebung im Sinne leichterer Aussalzbarkeit unter Vermehrung des Gesamteiweißes, wie wir sie gesetzmäßig im Verlauf der antitoxischen Diphtherieimmunisierung beim Pferde beobachten konnten, hier durchaus fehlt.

Tabelle X.

Bezeichnung	Gesamteiweiß pro ccm Serum	Pseudoglobulin pro ccm Serum	Albumin pro ccm Serum	Pseudoglobulin Proz.	Albumin Proz.	Eiweißquotient	Anmerkung
Ochse I, vom 28. V. 13 (15fach)	0,084	0,023	0,040	27,4	47,6	1,1	—
Kalbin II, vom 4. V. 21 (< 40 fach)	0,080	0,030	0,037	37,5	46,3	1,16	—
Kalbin II, vom 7. XII. 21 (60 fach)	0,071	0,021	0,035	29,6	49,3	1,03	1. Aderlaß
Kuh IV, vom 19. VII. 22 (< 40 fach)	0,070	0,010	0,032	14,3	45,7	1,19	1. Aderlaß, hochträchtig
Ochse III, vom 16. VIII. 22 (< 40 fach)	0,076	0,007	0,038	9,0	50,0	1,0	1. Aderlaß
Durchschnitt	0,076	0,018	0,036	23,7	47,4	1,11	—

Abgesehen von den großen individuellen Unterschieden im relativen Verhältnis der beiden Globulinanteile weichen die Zahlen von den entsprechenden Normalwerten nicht erheblich ab. Da aber durch unsere Feststellungen beim Pferde (Tabelle IV) feststeht, daß die Höhe des Antitoxintiters keinerlei Beziehung zu der eventuellen Eiweißumwandlung hat, wird man auch das hier beobachtete gleichzeitige Ausbleiben letzterer und guter Antitoxinbildung nicht in ursächlichen Zusammenhang bringen können. Das Fehlen der gleichsinnigen Eiweißveränderungen wird vielmehr im Hinblick auf die bei Rindern von uns beobachtete viel geringere Toxinempfindlichkeit — vierfach größere Dosen als bei Pferden werden reaktionslos vertragen — eher mit dem Fehlen solcher Reaktionen in Zusammenhang zu bringen sein. Antitoxinbildung war übrigens, wenn auch in geringerer Stärke, erfolgt, die Eiweißumwandlung aber ganz ausgeblieben.

III.

Es wurde bereits mehrfach hervorgehoben, daß es sich bei den im Eiweißaufbau eines Serums unter verschiedenen Einflüssen eintretenden Veränderungen nicht um eine echte Umwandlung der einzelnen Eiweißarten handeln dürfte, wie *Moll* seinerzeit annahm und neuerdings *Reitstötter* anscheinend voraussetzt, sondern einfach um eine *Verschiebung der Aussalzbarkeitszonen* im Sinne leichterer Fällbarkeit, wie sie bei Kolloiden entsprechend der Theorie von *Michaelis* und *Rona* auftritt. Es dürften daher schon die durch fraktionierte Aussalzung aus normalen frischen Seris gewonnenen Fraktionen, die wir bisher als Albumine, Pseudoglobuline und Euglobuline bezeichneten, nicht ganz übereinstimmen mit den unter geänderten Bedingungen bei denselben Salzgehalten ausfallenden Fraktionen. Darin wird wohl auch der Grund der widersprechenden Angaben über die Zugehörigkeit der Antikörper zu bestimmten Fraktionen des Eiweißes zu suchen sein. Bei dem engen Zusammenhang der Antikörper mit dem zugehörigen Serumeiweiß war aber von vornherein zu erwarten, daß erstere die Verschiebungen der Aussalzbarkeit, die das zugehörige Eiweiß eventuell erfährt, vollkommen mitmachen werden und demnach unter geänderten Bedingungen (Erwärmung, Altern) teilweise in anderen Fraktionen aufgefunden werden könnten als vorher. Für das durch Hitzeinaktivierung „denaturierte" Serumeiweiß hat die gleichsinnige Verschiebung der Fällbarkeitsgrenzen der Antitoxine und Globuline *Homer* bereits nachgewiesen. Nach den Feststellungen dieser Forscherin enthält die antitoxinhaltige Fraktion, die aus denaturiertem Serum zwischen 30 und 50 Proz.

Sättigung mit Ammonsulfat ausfällt, nicht nur Pseudoglobuline, sondern auch Albumin bzw. ist die totale Fällung der Antitoxine und Pseudoglobuline schon bei 42 bis 44 Proz. Sättigung erfolgt. Es schien uns zunächst aus praktischen Gründen von großem Interesse, festzustellen, ob analoge Verschiebungen der Fällbarkeit der Antikörper auch unter dem Einfluß des spontanen Alterns der Sera zustande kommen, da dieses ebenfalls, wie oben gezeigt, gesetzmäßig zu einer Vermehrung der leichter aussalzbaren Eiweißfraktion auf Kosten der schwerer fällbaren führt. Bekanntlich erfolgt beim Altern der Immunsera aber auch ein mehr oder weniger ausgiebiger Rückgang ihres Antikörpergehaltes, speziell auch des Antitoxintiters der Diphtheriesera. Vor allem war daher der eventuelle Kausalnexus dieser beiden Phänomene zu untersuchen. Da es aus technischen Gründen nicht möglich war, ein und dieselben Sera nach genügend langen Intervallen auf ihren Antitoxintiter sowohl, als auch auf ihren Eiweißaufbau zu prüfen, mußten wir wieder zu dem Auskunftsmittel des Vergleiches größerer Reihen greifen. Auf Grund unserer früheren Feststellung können wir voraussetzen, daß größere Gruppen von Diphtherieseren ohne Rücksicht auf ihren Titer in frischem Zustande annähernd übereinstimmende Durchschnittswerte der einzelnen Fraktionen aufweisen. Ein stärkeres Abweichen dieser Größen bei einer Gruppe älterer Sera gegenüber einer anderen gleichalterigen war somit ohne weiteres als Ausdruck stärkerer Veränderungen im Eiweißaufbau der ersteren Gruppe zu verwenden. Es war somit einfach zu prüfen, ob eine größere Anzahl älterer Sera, bei denen ein beträchtlicher Antitoxinabfall eingetreten war, andere Durchschnittszahlen ergibt als eine Reihe gleich alter Sera, die viel geringeren Titerrückgang gezeigt haben. 34 Diphtheriesera konnten in dieser Richtung als Material dienen, wobei das Intervall zwischen der unmittelbar nach dem Aderlaß erfolgten ersten Titerbestimmung und der zugleich mit der Eiweißbestimmung durchgeführten neuerlichen Prüfung zwischen 10 und 34 Monaten betrug. Werden diejenigen Sera, welche in der Zwischenzeit mehr als 25 Proz. ihres ursprünglichen Wertes verloren hatten, einerseits, die anderen Sera, welche weniger als 25 Proz. eingebüßt hatten, andererseits zusammengefaßt, so ergeben sich zwei gleich starke je 17 Sera, wobei eine Bedeutung der Länge des Intervalles für das Ausmaß des Titerrückganges nicht in Erscheinung trat. Aber auch die erwarteten Differenzen im Eiweißaufbau der beiden Gruppen waren keineswegs erkennbar: Beide Gruppen wiesen je vier Sera mit einem Eiweißquotienten über dem Durchschnitte des ganzen Materials (6,3), je neun Sera mit einem Eiweißquotienten über 4,0 auf, und die Durchschnittswerte der Eiweißquotienten zeigten sogar ein geringes Überwiegen der Gruppe mit schwächerem Antitoxinrückgang (6,7 gegen 5,9). Unter den wenigen zurückgegangenen fanden sich aber auch drei Sera mit abnorm hohen Quotienten (über 10), während unter den anderen nur eine solche Ziffer vorkam. Noch überzeugender aber scheint uns die Feststellung, daß der überhaupt größte Eiweißquotient (28,7!) bei einem Serum gefunden wurde, das bei 16monatigem Intervall überhaupt keinen nachweisbaren Titerrückgang erkennen ließ, während umgekehrt das Serum mit dem größten Wertabfall (mehr als 50 Proz.) nur einen sehr niedrigen Quotienten (2,9) aufwies. Wir glauben somit sehr wahrscheinlich gemacht zu haben, daß *Wertrückgang der antitoxischen Diphtheriesera und Änderung im Eiweißaufbau im Sinne leichterer Aussalzbarkeit Vorgänge sind, die unabhängig voneinander beim Altern der Sera stattfinden.*

Es blieb gleichwohl zu untersuchen, ob die Verschiebung der Aussalzbarkeitsgrenzen der Eiweißfraktionen zu einer gleichsinnigen der Antikörper führt. Die Frage war aber nur unter der Voraussetzung mit einiger Aussicht anzugehen, daß die Antikörper wenigstens im frischen Sera konstant an bestimmte Aussalzungsgrenzen gebunden sind. Auf Grund der vielseitigen einleitend besprochenen Bearbeitung gilt aber diese Annahme sogar für das zunächst interessierende Diphtherieantitoxin nur insoweit, als wohl die schwerst aussalzbare Fraktion praktisch frei von Antitoxin zu sein scheint, was auch unseren eigenen Befunden durchaus entspricht. Keineswegs aber steht letzteres auch für die schon vor der Drittelsättigung mit Ammonsulfat ausfallende Fraktion fest, wie *Pick* ursprünglich angegeben hatte (*Porges*, *Pribram*, *Ledingham*). Bei den technischen Schwierigkeiten, die einer einwandfreien Beantwortung entgegenstehen, glaubten wir einen Standpunkt in dieser Frage nur durch eigene Versuche begründen zu können. Es wurde daher zunächst ein frisches Diphtherieserum in bezug auf die Verteilung der Antitoxine auf die den innegehaltenen Aussalzungsgrenzen entsprechenden Fraktionen systematisch geprüft (Tabelle XI).

Tabelle XI.

Versuch vom 26. XI. 1920 über die Antitoxinverteilung auf die Eiweißfraktionen.

5 ccm Diphtherieserum Capitän vom 22. IX. 1920 (480 fach, somit 2400 A.-E, Eiweißgehalt pro 1 ccm 0,086 g).

+ 5 ccm physiologische Lösung + 5 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung.

Klar filtriert ergibt Filtrat 1 und Rest 1.

a) *Filtrat 1*, 11,5 ccm (Eiweißgehalt, d. h. Pseudoglobulin + Albumin pro 1 ccm Serum 0,074 g).

Es enthielt somit 1 ccm Serum 0,012 g Euglobuline.

Wert des Filtrates 1 150 fach, somit kleiner als 480: 3, bzw. die Euglobuline in 1 ccm Serum enthalten 480 — 450 = 30 A.-E. oder pro 1 g Euglobulin etwa 2500 A.-E.

Rest 1 enthält 3,5 ccm Filtrat 1 + Euglobulin aus 5 ccm Serum, somit 0,086 g + 0,06 g = 0,146 g Eiweiß.

Wert nach Auflösung in 14 ccm physiologischer Lösung weniger als 36 fach, somit in Rest 1 im ganzen 17,5 × 36 = 630 A.-E.

Die Euglobuline aus 5 ccm Serum enthalten somit 630 — 625 A.-E. (entsprechend 3,5 ccm Filtrat 1) = 105 A.-E. oder pro 1 g etwa 1750 A.-E.

b) 7,5 ccm Filtrat 1 (0,185 g Eiweiß mit 1125 A.-E.) + 2,5 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung (somit Halbsättigung).

Klar filtriert ergibt Filtrat 2 und Rest 2.

Filtrat 2, 6 ccm (Eiweißgehalt, d. h. Albumine allein pro 1 ccm Serum 0,0254 g).

Wert des Filtrates 2 kleiner als 15/4 fach, somit enthalten die Albumine aus 1 ccm Serum weniger als 15 A.-E. (weitere Auswertung wegen des hohen Ammonsulfatgehaltes nicht ausgeführt), pro 1 g Albumin ergeben sich weniger als 600 A.-E.

Rest 2 enthält 4 ccm Filtrat 2 + Pseudoglobulin aus 2,5 ccm Serum, somit 0,0254 g + 2,5 × (0,074 — 0,0254) g = 0,147 g Eiweiß, somit Pseudoglobulin pro 1 ccm Serum 0,048 g.

Wert nach Auflösung in 16 ccm Aqua dest. 1125/20 fach, somit in Rest 2 im ganzen 1125 A.-E.

Filtrat 2 (Albumine) enthält daher praktisch keine Antitoxineinheiten, alle A.-E. im Rest 2 entfallen auf die Pseudoglobuline (0,01215 g), somit enthalten die Pseudoglobuline in 1 ccm Serum (0,0486 g) 450 A.-E. oder pro 1 g Pseudoglobulin 9260 A.-E.

Der mit äußerster Sorgfalt durchgeführte Versuch ergibt, daß die bei $^1/_3$ Sättigung ausfallende, ungefähr 14 Proz. des Gesamteiweißes ausmachende Fraktion (Euglobuline) immerhin etwa 30 A.-E. pro 1 ccm Serum, demnach etwa 6 Proz. der Antitoxine enthielt. Der ganze übrige Anteil der letzteren war in der zwischen $^1/_3$ und $^1/_2$ Sättigung ausfallenden, ungefähr 66,5 Proz. des Eiweißes umfassenden Fraktion (Pseudoglobuline) enthalten, wogegen die bei Halbsättigung noch gelöst bleibende, 29,5 Proz. des Eiweißes ausmachende Fraktion (Albumine) praktisch von Antitoxinen vollkommen frei war. Es muß dahingestellt bleiben, inwiefern dieses Ergebnis auf der ursprünglichen Zugehörigkeit der Antitoxine zu den betreffenden Eiweißfraktionen beruht oder nur Absorptions-Phänomenen bei der sukzessiven Ausfällung zugeschrieben werden muß. Jedenfalls ist das bei $^1/_3$ Sättigung ausfallende Eiweiß (Euglobuline) ebenfalls als Träger von Antitoxinen nachgewiesen. Es war nunmehr festzustellen, ob der auf diese Eiweißfraktion entfallende Anteil an Antitoxinen wenigstens in frischen Seris einigermaßen konstant ist. Zu diesem Zwecke wurden sechs gleich alte Sera von gleich lange und in gleicher Weise immunisierten Diphtheriepferden auf ihren Wert ohne weitere Behandlung und nach Wegfiltrieren des bei $^1/_3$ Sättigung und $^1/_3$ Verdünnung ausfallenden Niederschlages geprüft.

Tabelle XII.

	Eduard	Ente	Eos	Erika	Eskimo	Esther
(ohne Behandlung) geprüft auf	400 fach: überlebt mit Erscheinung.	400 fach: † 4. Tag	200 fach: † 2. Tag, 150 fach: fast glatt	150 fach: überlebt mit Erscheinung.	200 fach: überlebt mit geringen Erscheinungen	200 fach: überlebt mit schweren Erscheinungen
nach $^1/_3$ Sättigung in Filtration geprüft auf	140 fach (= $^{420}/_3$): † 3. Tag	133 fach (= $^{400}/_3$): überlebt mit schweren Erscheinungen	60 fach (= $^{180}/_3$): überlebt mit Erscheinung.	45 fach (= $^{135}/_3$): † 2. Tag	60 fach (= $^{180}/_3$): † 3. Tag	60 fach (= $^{180}/_3$): † 2. Tag
Verlust	fast 0	0	0	> 10 Proz.	etwa 20 Proz.	> 10 Proz.

Der Verlust bzw. der auf die Euglobuline entfallende Antitoxinanteil schwankt somit (Tabelle XII) schon bei frischen Seris ganz gleicher Vorgeschichte zwischen 0 und 20 Proz., was bei der Genauigkeit der antitoxischen Diphtheriebestimmungen durch individuelle Bewertungsunterschiede gewiß nicht ausreichend erklärt werden kann. Bei dieser Sachlage war es aber ziemlich aussichtslos, die weitere Frage der Verschiebung der Aussalzbarkeit der Antikörper bezüglich der $^1/_3$ Sättigung zu verfolgen, und mußten wir uns bescheiden, die Verhältnisse bei der $^1/_2$ Sättigung allein zu untersuchen, da hier nach allgemeiner Annahme die konstante Grenze der vollkommenen Aussalzung der Antitoxine liegt. Unsere eigenen Erfahrungen bei der Serumkonzentrierung im großen sprechen ebenfalls dafür, daß bei $^1/_2$ Sättigung so ziemlich die ganzen Antitoxine ausgesalzen werden, immerhin schien uns eine systematische Überprüfung erwünscht. Es wurden daher von acht gleich alten Diphtherieseren länger immunisierter Pferde, deren Titer bekannt war, Filtrate nach 45 und 50 Proz. Sättigung mit Ammonsulfat auf das Vorhandensein von wenigstens

4 Proz. der ursprünglich vorhandenen Antitoxine geprüft. Im Hinblick auf die beim Aussalzen erfolgende vierfache Verdünnung wurden somit die Filtrate auf 1 Proz. des ursprünglichen Wertes untersucht.

Tabelle XIII.

Pferd:	Dagmar	Dame	Despot	Dietrich
Ohne Behandlung geprüft auf	250 fach: glatt, 280 fach: geringe Erscheinungen	400 fach: geringe Erscheinungen	600 fach: glatt	220 fach: geringe Erscheinungen
45 proz. Filtrat geprüft auf	3 fach: fast glatt	4,5 fach: glatt	6,5 fach: glatt	2,5 fach: glatt
50 proz. Filtrat geprüft auf	3 fach: überlebt mit schweren Erscheinungen	4,5 fach: † 2. Tag	6,5 fach: überlebt mit schweren Erscheinungen	2,5 fach: † 2. Tag

Pferd:	Diva	Dollar	Drude	Durst
Ohne Behandlung geprüft auf	250 fach: fast glatt	400 fach: überlebt mit schweren Erscheinungen	450 fach: geringe Erscheinungen	250 fach: fast glatt
45 proz. Filtrat geprüft auf	3 fach: fast glatt	4,2 fach: glatt	4,5 fach: glatt	3 fach: glatt
50 proz. Filtrat geprüft auf	3 fach: † 1. Tag	4,2 fach: † 1. Tag	4,5 fach: † 1. Tag	3 fach: † 1. Tag

Bei 50 proz. Sättigung mit Ammonsulfat waren also (Tabelle XIII) bei den meisten Seris die Antitoxine so gut wie völlig ausgesalzen, nur bei zwei von acht scheinen noch geringe Mengen, die aber auch bei weitem nicht 4 Proz. der Gesamtantitoxine ausmachten, in den Filtraten zurückgeblieben zu sein. Bei 45 proz. Sättigung dagegen waren in allen Seris weit mehr als 4 Proz. der Antitoxine noch nicht ausgefällt, so daß zwischen 45- und 50 proz. Sättigung in frischen Seris noch beträchtliche Antitoxinmengen ausfallen müssen.

Zum Vergleich wurden nunmehr Filtrate nach 45 proz. und 48 proz. Sättigung von zehn fast 3 Jahre alten Seris geprüft (Tabelle XIV).

Tabelle XIV.

Pferd:	Aar	Arkade	Alpe	Block	Brise
Ohne Behandlung geprüft auf	560 f.: mäßige Erscheinungen	400 fach: überlebt mit schw. Erscheinungen	250 f.: geringe Erscheinungen	350 fach: † 3. Tag	400 fach: glatt, 500 fach: † 2. Tag
45 proz. Filtrat geprüft auf	3,75 fach: glatt	3 fach: glatt	1,8 fach: fast glatt	2,4 fach: glatt	2,8 f.: geringe Erscheinungen

Pferd:	Wildfang	Arena	Amme	Banus	Base
Ohne Behandlung geprüft auf	400 fach: mäßige Erscheinungen	600 f.: überlebt mit schweren Erscheinungen	350 fach: † 3. Tag	200 f.: überlebt mit schweren Erscheinungen	200 f.: überlebt mit schweren Erscheinungen
48 proz. Filtrat geprüft auf	3 fach: † 2. Tag	4,5 fach: † 3. Tag	2,4 fach: † 1. Tag	1,5 fach: † 1. Tag	1,5 fach: † 1. Tag

Da nur der seinerzeitige Wert bekannt war, mußte der Nachprüfung im Hinblick auf den notorisch bei so langer Aufbewahrung auftretenden Wertrückgang ein entsprechend verminderter Wert zugrunde gelegt

werden. Unter der Annahme, daß etwa $\frac{1}{4}$ des Wertes schon durch die Lagerung weggefallen sei, erfolgte somit die Prüfung auf $\frac{3}{4}$ Proz. des ursprünglichen Wertes. Wegen der geringen verfügbaren Mengen konnten auch nicht beide Ausfällungen an denselben Seris durchgeführt werden, sondern wir mußten uns begnügen, die eine Gruppe bei 45 Proz., die andere bei 48 Proz. auszusalzen. Die 45 proz. Filtrate der alten Sera besaßen ebenfalls alle noch deutliche antitoxische Wirksamkeit, während die 48 proz. Filtrate durchweg weit unterhalb der von uns geprüften Grenze von 3 Proz. des ursprünglichen Antitoxingehaltes zurückblieben. Man müßte daher annehmen, daß in alten Seris die letzten Antitoxinanteile schon zwischen 45- und 48 proz. Sättigung ausfallen, während bei frischen Seris manchmal sogar bei 50 proz. Sättigung noch nicht alle Antitoxine ausgesalzen werden. Sonach führt anscheinend das Altern der Sera tatsächlich nicht nur zu einer Verschiebung der Aussalzbarkeit der Eiweißkörper, sondern auch zu einer gleichsinnigen Änderung im Verhalten der Antitoxine, worin wohl ein Argument für die enge Zusammengehörigkeit der letzteren mit den sie tragenden Eiweißkörpern erblickt werden kann. Immerhin muß erwähnt werden, daß auch in frischen Seris die völlige Ausfällung der Antitoxine mehr oder weniger oft schon bei 48 proz. Sättigung eintritt, so daß die Verschiebung der Fällungsgrenze für Antitoxine durch das Altern keinesfalls sehr beträchtlich sein kann. Sie erreicht gewiß nicht das Ausmaß der von *Homer* bei Hitzedenaturierung nachgewiesenen. Auch dürften gewisse Anteile der in frischen Seris erst nach 50 proz. Sättigung ausfallenden Eiweißkörper in alten Seris noch unter 48 proz. Sättigung ausgesalzen werden, da die zwischen beiden Grenzen entstehenden Niederschläge nicht sehr beträchtlich sind, während doch nach unseren früheren Feststellungen infolge des Alterns namhaft größere Anteile des Eiweißes bei 50 proz. Sättigung ausfallen als vorher.

Zusammenfassung.

Durch gewichtsanalytische Bestimmung der bei $^1/_2$ bzw. $^1/_3$ Sättigung mit Ammonsulfat aus verschiedenen Seris ausfallenden Eiweißfraktionen bzw. von deren relativem Verhältnis zu den nicht ausfallenden (Eiweißquotient) wurde folgendes festgestellt:

1. Zwischen den individuellen Werten von Pferden gleicher Kategorie (normal oder immunisiert) bestehen Unterschiede, die bei weitem die Differenzen der Durchschnittswerte der Kategorien übertreffen.

2. „Alte" und „frische" Sera gleicher Kategorie zeigen eine charakteristische Verschiedenheit, indem der Eiweißquotient ersterer merklich erhöht ausfällt. Ihr Eiweiß ist somit *labiler* als das des frischen Serums.

3. Diphtheriesera unterscheiden sich von normalen Pferdeseris durch erhöhten Gesamteiweißgehalt, absolut und relativ vermehrte Globuline, insbesondere Pseudoglobuline, absolut und relativ verminderte Albumine. Diese Verschiebung im Eiweißaufbau im Sinne *höherer Labilität* findet *gesetzmäßig* während der Diphtherieimmunisierung der Pferde statt.

4. Die charakteristische Veränderung im Eiweißaufbau der Diphtheriesera ist aber keineswegs der Ausdruck oder die Voraussetzung der Antitoxinbildung, da sie in keiner Weise mit dem Antitoxingehalt der Sera im Zusammenhang steht. Dagegen scheint eine gewisse Labilität im Eiweißaufbau (also hoher Eiweißquotient) beim normalen Pferde eine günstige Disposition für gute Antitoxinbildung anzuzeigen.

5. Das Ausmaß der charakteristischen Veränderungen ist abhängig von der Dauer der erfolgten Immunisierung bzw. von der Anzahl der erfolgten Aderlässe, nicht aber von den einverleibten Toxinmengen. Gleichwohl muß jene als Ausdruck bestimmter Reaktionen, die im Verlauf der Diphtherieimmunisierung eintreten, aufgefaßt werden. Das Fieber ist eine solche Reaktion, aber zweifellos nicht die einzige.

6. Bei andersartiger Immunisierung von Pferden (Cholera, Meningokokken, Dysenterie, Gasbrand, Tetanus) fehlen analoge Veränderungen im Verlaufe der Immunisierungen.

7. Der Eiweißaufbau der normalen Sera verschiedener Tierarten weist starke, artcharakteristische Unterschiede auf, ohne daß Beziehungen zur Antitoxinbildungsfähigkeit erkennbar wären.

8. Bei Rindern tritt nach Diphtherieimmunisierung keine analoge Veränderung in der Eiweißfällbarkeit auf wie bei Pferden.

9. Der beim Altern beim Diphtherieserum eintretende Titerrückgang steht in keinem Zusammenhang mit der ebenfalls beim Altern konstatierten erhöhten Eiweißlabilität.

10. Die Verschiebung der Aussalzbarkeit der Eiweißkörper unter dem Einfluß des Alterns geht mit einer gleichsinnigen Verschiebung der Aussalzbarkeit der Antitoxine einher. In alten Seris werden alle Antitoxine schon bei höchstens 48 Proz. Ammonsulfat ausgefällt.

11. Die leichtest fällbare Fraktion (Euglobuline) enthält schon bei frischen Seris, noch mehr bei alten nennenswerte, individuell verschieden hohe Anteile der Diphtherieantitoxine.

Literatur.

Alder, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **126**, 1918. — *J. P. Atkinson*, Journ. of hyg. **7**, 1907. — *W. Beljaeff*, Zentralbl. f. Bakteriol. Orig. I, **33**, 1903. — *P. W. Butjagin*, Hyg. Rundschau 1902. — *Bywaters* und *Tasker*, Journ. of physiol. **47**, 1913. — *Chick*, Biochem. Journ. **7**, 1913; **8**, 1914. — *Chick* und *Martin*, Journ. of physiol. **45**, 1912. — *Dieselben*, Biochem. Journ. **7**, 1913. — *De Crinis*, Monatschr. f. Psych. u. Neurol. **42**, 1917. — *Doerr* und *Berger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. **93**, 1921. — *Emmerich* und *Tsuboi*, Die Natur der Schutz- und Heilsubstanzen des Blutes. Wiesbaden 1892. — *Freund* und *Joachim*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 1902. — *Fuld* und *Spiro*, ebendaselbst **31**, 1900. — *Gibson*, Journ. f. biol. Chem. **12**, 1912. —

K. Glässner, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. **2**, 1906. — *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem. 1910. — *Hansen* und *Mc. Quarrie*, Journ. of pharm. **10**, 1917. — *Hardy* und *Gardener*, Journ. de physiol. **40**, 1910. — *Haslam*, ebendaselbst **44**, 1912. — *Derselbe*, Biochem. Journ. **7**, 1913. — *Hess*, Journ. of exper. Med. **24**, 1916. — *A. Homer*, Biochem. Journ. **11**, 1917; **12**, 1918; **13**, 1919. — *Joachim*, Pflügers Arch. **93**, 1903. — *Langstein* und *Mayer*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 1904. — *Ledingham*, Journ. of Hyg. **7**, 1907. — *Michaelis*, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. **3**. — *Moll*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 1904. — *Derselbe*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap. **3**, 1906. — *P. Th. Müller*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**, 1906. — *Pfeiffer* und *Proskauer*, Zentralbl. f. Bakteriol. Orig. I, **19**, 1896. — *E. P. Pick*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 1902. — *Derselbe*, Darstellung der Antigene mit chemischen und physikalischen Mitteln im Handbuch der Technik von Kraus und Levaditi **1**. — *Porges* und *Spiro*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 1903. — *E. Pribram*, Darstellung der Antikörper mittels chemischer und physikalischer Methoden im Handbuch der Technik von Kraus und Levaditi **2**. — *Reitstötter*, Österr. Chem.-Ztg. **25**, H. 5, 1922. — *Derselbe*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **30**, 1921. — *B. Robertson*, Journ. of biol. Chem. **11**, 1912; **13**, 1912. — *Derselbe*, ebendaselbst **22**, 1915. — *J. Rodhain*, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 1903. — *Rona* und *Michaelis*, diese Zeitschr. **5**, 1907. — *Schmidt-Skolfield* und *Schmidt*, Journ. of Immun. **2**, 1917. — *Starke*, Zeitschr. f. Biol. **68**, 1917. — *Szontag* und *Wellmann*, Deutsch. med. Wochenschr. 1898. — *Thomas* und *Lock*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 1913. — *Thompson* und *Briggs*, Journ. of biol. Chem. **20**, 1915. — *Wiener*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **74**.

Über Elektropie.

VII. Mitteilung:

Über die Ausscheidung der elektropen Farbstoffe und Carbinole.

Von

L. Karczag und L. Paunz.

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 1. Januar 1924.)

Wir haben bereits über die Resorption der elektropen Farbstoffe und Carbinole (Fuchsin S, Lichtgrün und Wasserblau) aus dem subkutanen Gewebe, sowie über ihre Umwandlung und Ausscheidung im Tierversuche berichtet[1]). In vorliegender Mitteilung möchten wir einerseits über neue Tatsachen, welche sich aus seitdem in großer Zahl ausgeführten Tierversuchen ergaben, sowie über die Ausscheidungsverhältnisse der elektropen Farbstoffe beim Menschen berichten.

1. Harn und Galle.

Harn.

Wir sahen bereits, daß subkutan einverleibte Farbstoffe sowie die aus ihnen innerhalb des Tierorganismus entstandenen Carbinole zwei Hauptausscheidungswege befolgen. Der eine Hauptausscheidungsweg ist die Niere, der andere die Leber. Die Farbstoffe passieren die Glomeruli und Tubuli, ohne aufgenommen zu werden, und kommen als solche zur Ausscheidung; die Carbinole werden aber durch die Nierentubuli bzw. durch gewisse topographische Abschnitte derselben elektiv adsorbiert. Es ist anzunehmen, daß unter Umständen, falls dem Tierkörper ein großes Carbinolgebot zur Verfügung steht, auch Carbinole als solche ausgeschieden werden, obzwar man dessen bedacht sein muß, daß die ausgeschiedenen Farbstoffe in den Nierenbecken, Uretheren und Harnblase durch den alkalischen Harn umgelagert werden können.

Versuch Nr. 48. Kaninchen. Gewicht 1640 g. Erhält während einer halben Stunde 40 ccm 2,5proz. Wasserblaulösung intravenös injiziert. 10 Minuten nach der letzten Injektion wird die Blase entleert. Der Urin erscheint hellgelb, durchsichtig. Nach Zusatz von einigen Tropfen verdünnter Salzsäure gewinnt er aber eine tiefblaue Farbe. Nach Verabreichung weiteren 20 ccm Farbstoffes wird der Urin auch vor dem Salzsäurezusatz allmählich immer farbiger, um 2 Stunden später bereits dunkelblau entleert zu werden.

---

[1]) *L. Karczag* und *L. Paunz*, Über Elektropie. V. Diese Zeitschr. **138**, H. 4/6, S. 412, 1923.

So kommt es, daß der Harn der Tiere oft kaum gefärbt ist, aber nach Behandlung mit Salzsäure infolge Regeneration der Carbinole stark farbig wird.

Je umlagerungsfähiger der Farbstoff, je feiner die Dispersität, desto schneller die Ausscheidung des Farbstoffes und des Carbinols, je langsamer im allgemeinen die Umlagerungsfähigkeit und je gröber die Dispersität, desto langsamer die Ausscheidung des Farbstoffes als auch des Carbinols. Dementsprechend wird Fuchsin S am schnellsten, Wasserblau am langsamsten ausgeschieden, und auch die Carbinole scheinen sich in gleichem Sinne zu verhalten.

Diejenigen Versuche, welche wir aus therapeutischen Indikationen beim Menschen angestellt haben, zeigten ebenfalls, daß Fuchsin S, in einer Dosis von 0,10 g intramuskulär einverleibt. schon nach 10 bis 30 Sekunden im Harn erscheint, daß dagegen Lichtgrün und Wasserblau, in der zwei- bis dreifachen Dosis einverleibt, während dieser Zeit nicht zur Ausscheidung gelangt. (Das schnelle Erscheinen des Säurefuchsins in dem Harn bei unseren Kranken, an denen ein Uretherkatheterismus vorgenommen werden mußte, veranlaßt uns, diesen Farbstoff zu Nierenfunktionsprüfungen zu verwenden.) Es soll erwähnt werden, daß wir uns über die Unschädlichkeit der Farbstoffe vorher in Tierversuchen überzeugt haben und in mikroskopischen Schnitten weder bei Tieren (Kaninchen, Meerschweinchen), welche eine einmalige zehntausendfache Dosis der an Menschen verabreichten, noch bei Tieren, welche zwei bis drei Monate lang die gleiche Tagesdosis, wie dies an Menschen verabreicht wurde, erhielten, pathologisch-anatomische Veränderungen feststellen konnten.

Das Material unserer Tierversuche enthält auch neu geprüfte elektrope Farbstoffe, von denen in einer folgenden Mitteilung berichtet wird.

Nr.	Farbstoff	Tier	Anwendung	Dosis g	Harn	Regenerationsharn	Bemerkung
36	Kristallviolett	Meerschweinchen	subkutan 12 Std.	0,5	0	±	Mehrtägige Vorbehandlung mit dem Farbstoff
44	Methylviolett	"	subkutan 12 Std.	1,0	±	±	
74	Kresylviolett.	Kaninchen	intravenös 2 Std.	0,5	++ blau	++ rot	
69	Fuchsin . . .	"	intravenös 2 Std.	0,25	0 gelblichbraun	+ rosarot	
51	Anilinblau . .	Meerschweinchen	subkutan 12 Std.	0,5	++++	++++	
67	Säureviolett .	Kaninchen	intravenös 2 Std.	0,75	++++	++++	
43	Indigokarmin.	Meerschweinchen	subkutan 12 Std.	0,6	++++	++++	

Galle.

Der zweite Hauptausscheidungsort der Farbstoffe und der Carbinole ist die Leber. Wir haben bereits die Ausscheidung von Fuchsin S-, Wasserblau- und Lichtgrüncarbinolen, sowie auch diejenige des Indigocarmins und Pyrrolblaus mit der Galle gesehen. Die Farbstoffe wurden den Tieren damals subkutan einverleibt. Seitdem haben wir andere Farbstoffe bzw. Carbinole in dem Gallenblaseninhalt der Tiere nach subkutaner und intravenöser Einfuhr nachweisen können.

Nr.	Farbstoff	Tier	Anwendung	Dosis g	Sektionsgalle	Regenerationsgalle	Bemerkung
36	Kristallviolett	Meerschweinchen	subkutan 12 Std.	0,5	0	0	Mehrtägige Vorbehandlung mit dem Farbstoff
44	Methylviolett	„	subkutan 12 Std.	1,0	0 gelb	± (?) grünlich	
74	Kresylviolett.	Kaninchen	intravenös 2 Std.	0,5	0	0	
67	Säureviolett.	„	intravenös 2 Std.	0,75	++++	++++	

Wir haben beim Menschen, denen Fuchsin S, Lichtgrün, Wasserblau und Indigocarmin intragluteal einverleibt wurden, mit *Hetényi* Duodenalsondierungen vorgenommen, um auch beim Menschen die prinzipiell wichtige Ausscheidung der Carbinole durch die Gallenwege nachzuweisen. Aus Fuchsin S wurde bei sieben Menschen pro Dosis 0,08 g (4 ccm einer 2proz. Lösung), aus Lichtgrün bei drei Menschen die gleiche Menge, Wasserblau bei zwei Menschen 0,06 g, Indigocarmin bei elf Menschen 0,10 g verabreicht. Die Duodenalsondierung ergab, daß in mehreren Fällen das Fuchsin S als Carbinol im ungefärbten Duodenalinhalt ausgeschieden wurde, ebenso konnte das Indigocarmin durch Behandlung des Duodenalsaftes mit Salzsäure mit der blauen Originalfarbe regeneriert werden. Wir möchten diesen prinzipiell wichtigen Befund besonders mit Rücksicht auf die geübte Chromocholoskopie bzw. Funktionsprüfung der Leber mit Farbstoffen hervorheben, um darauf aufmerksam zu machen, daß bei *den Entfärbungsprozessen* der Farbstoffe innerhalb des Organismus außer den Reduktionsvorgängen auch die intramolekularen Umlagerungen, bei denen die elektrostatischen Ladungen als Entfärbungsursachen wirken, zu berücksichtigen sind.

2. Die Beeinflussung der Farbstoff- und Carbinolausscheidung durcheinander in dem Simultanversuch[1]).

Interessante und wichtige Aufschlüsse lieferten uns die mit den Farbstoffen simultan angestellten Versuche. Im folgenden sei folgender Versuch, welcher gleichzeitig mit den drei Farbstoffen: Fuchsin S, Lichtgrün und Wasserblau angestellt wurde, beschrieben.

Simultanversuch Nr. 26. Kaninchen, 4 kg schwer, erhielt subkutan während 12 Stunden je 7,25 g Fuchsin S, Wasserblau und Lichtgrün in 2,5proz. Lösung.

Bei der Sektion finden wir die Galle grasgrün gefärbt, während der Urin eine bräunlich rote Farbe aufweist. Auch nach Salzsäurezusatz werden diese Farben beibehalten.

Wie aus diesem Versuche zu ersehen ist, beeinflußten die Farbstoffe bzw. Carbinole gegenseitig ihre Ausscheidung. Wir haben zuvor

[1]) *L. Karczag* und *L. Paunz,* Über eine neue Vitalfärbungsmethode mit Sulfosäurefarbstoffen. Deutsche med. Wochenschr. 1923, Nr. 39.

bereits aus unseren singulären Färbungsversuchen feststellen können, daß das Fuchsin S am raschesten zur Ausscheidung gelangt und die relativ schwächste Histotropie besitzt, wogegen Wasserblau eine große Histotropie und eine geringere Urotropie besitzt. Die Simultanversuche zeigten, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Farbstoffe die Ausscheidung und die Tropie der Farbstoffe sich in dem Sinne beeinflussen, daß jeder Farbstoff die ihm eigentümliche Haupttropie befolgt. Das Fuchsin S bzw. dessen Carbinol weist die höchste Urotropie, Lichtgrün bzw. dessen Carbinol die stärkste Enterotropie, und Wasserblau bzw. dessen Carbinol die höchste Bindegewebstropie auf. Diese Bindegewebstropie des Wasserblaucarbinols konnte auch in den mikroskopischen Schnitten der Simultanversuche schön nachgewiesen werden. Nach erfolgter Regeneration der Carbinole in den Schnitten ließ sich die Blaufärbung am intensivsten erkennen, schwächer waren die regenerierbaren Färbungen mit Lichtgrün, und noch schwächer mit Fuchsin S. Wir möchten die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung eines Falles in folgendem mitteilen und zugleich auch die Wichtigkeit dieser geschilderten Befunde hervorheben, indem durch diese gezeigt werden konnte, daß *die Tropie eines Farbstoffes durch Gegenwart anderer stark zu beeinflussen ist.* Wir sind in unseren Farbstoffunktionsprüfungen gewöhnt (z. B. in denjenigen der Leber), die Retention des Farbstoffes auf funktionelle Veränderungen des Leberparenchyms zurückzuführen, und denken nicht daran, daß der Weg der Farbstoffausscheidung analog wie oben, durch andere in der Zirkulation pathologisch vorkommende Substanzen beeinflußt werden kann.

Die mikroskopische Untersuchung des Simultanversuchs ergab nach erfolgter Regeneration das folgende Resultat:

Rosarot: Sehnen, Markkanälchen der Niere, glatte Muskulatur einzelner Arterienwände.

Blau: Kollagene Fasern des lockeren Bindegewebes der Gedärme, der Luftröhre, Bronchien usw., das Perichondrium, Fascien, Dura mater, Follikelzellen der Eierstöcke, Bindegewebskapsel der Eierstöcke, der Milz usw. Gewundene Nierenkanälchen.

Grün: Gallenblase (die ganze Wand diffus durchgetränkt).

Violett: Viele Nierenkanälchen.

Ungefärbt: Zentralnervensystem, Knochen- und Fettgewebe, quergestreifte Muskulatur, Leber- und Milzparenchym, Nebenniere usw.

8. Liquor.

Wir haben von unseren Versuchstieren, welche sowohl subkutan wie auch intravenös die Farbstoffe erhielten, durch Suboccipital-Punktionen mit Hilfe einer Rekordspritze Cerebrospinalflüssigkeit ausgesogen. Bei Kaninchen erhielten wir etwa $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ ccm, bei Meerschweinchen 0,1 bis 0,3 ccm. Diese Mengen genügten vollständig zur Anstellung der Carbinolprobe mit verdünnter Salzsäure. Die Untersuchung ergab, daß einzelne Carbinole, wenn auch in geringer Menge, auch *im Liquor cerebrospinalis*

ausgeschieden werden. Die diesbezüglichen Resultate sind in folgender Tabelle veranschaulicht.

Nr.	Farbstoff	Tier	Versuchsmethodik	Liquor	Regenerationsstärke
64	Fuchsin S	Kaninchen	1,25 g intravenös 3 Std.	±	+
65	Lichtgrün	„	1,2 g intravenös 2 Std.	0	0
68	Wasserblau	„	0,75 g intravenös 2 Std.	0	±?
67	Säureviolett	„	0,75 g intravenös 2 Std.	0	0
69	Fuchsin	„	0,25 g intravonös 2 Std.	0	±?

4. Kammerwasser.

Durch Punktion der vorderen Augenkammer mit Hilfe einer Rekordspritze haben wir bei Kaninchen und Meerschweinchen etwa 0,1 bis 0,3 ccm farbloses Kammerwasser erhalten, welches nach Behandlung mit Salzsäure ebenfalls *eine oft beträchtliche Anwesenheit von Carbinolen verriet.* Die diesbezüglichen Daten aus unseren Versuchsprotokollen sind in folgendem zusammengestellt.

Nr.	Farbstoff	Tier	Versuchsmethodik	Kammerwasser	Regenerationsstärke
64	Fuchsin S . . .	Kaninchen	1,25 g intravenös 3 Std.	±	++
65	Lichtgrün . . .	„	1,2 g intravenös 2 Std.	±	++
68	Wasserblau . . .	„	0,75 g intravenös 2 Std.	±	++
67	Säureviolett . .	„	0,75 g intravenös 2 Std.	+	+±
69	Fuchsin	„	0,25 g intravenös 2 Std.	0	0

5. Fruchtwasser.

In einem Falle gelang uns bei einem Kaninchen das Fuchsin S-Carbinol im Fruchtwasser in Spuren nachzuweisen. In vier Fällen wurden die Carbinole im Fruchtwasser vermißt. Das Embryo war in jedem Falle ungefärbt.

6. Peritonealexsudat.

Wir haben bei einem an Tuberkulose gestorbenen Meerschweinchen im ungefärbten Peritonealexsudat durch die Salzsäurebehandlung eine intensive Regeneration von Wasserblau beobachten können.

Zusammenfassung.

Es konnte auf Grund eines großen Tiermaterials (200 Tiere) festgestellt werden, daß die Carbinole der elektropen Triphenylmethanfarbstoffe nach subkutaner und intravenöser Einverleibung außer im

Blute, im Harn, in der Galle, im Liquor cerebrospinalis, Kammerwasser, Peritonealexsudat erscheinen. Es wurden Beispiele dafür geliefert, daß bei Entfärbungsprozessen der Farbstoffe innerhalb des Organismus außer den Reduktionsvorgängen auch intramolekulare Umlagerungen. bei denen elektrostatische Ladungen als Entfärbungsursachen wirken, zu berücksichtigen sind.

Bei der Ausscheidung der elektropen Farbstoffe als Carbinole spielen die Dispersitätsverhältnisse der Farbstofflösungen eine wichtige Rolle. Fein disperse bevorzugen die Ausscheidung durch die Nieren (Fuchsin S), mitteldisperse die Gallenwege (Lichtgrün), grobdisperse werden schlecht ausgeschieden (Wasserblau, Pyrrolblau) und demgegenüber infolge ihrer Histotropie in den Geweben elektrostatisch fixiert.

Es konnte ferner gezeigt werden, daß die elektropen Farbstoffe in Simultanversuchen sowohl ihre Ausscheidung (als Farbstoffe und Carbinole), wie auch ihre Histotropie gegenseitig beeinflussen können.

Über die Dynamik der Phosphorsäure des Blutes.

Von

Heinz Lawaczeck.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Gießen.)

(Eingegangen am 4. Januar 1924.)

Untersucht man die freie (anorganische) Phosphorsäure des Gesamtblutes einmal unmittelbar nach der Entnahme aus der Vene und dann nach Defibrinierung des Blutes und Abkolieren des Fibrins, so findet man regelmäßig eine geringe Abnahme der freien Phosphorsäure. Zur Erklärung hierfür dienen zwei Möglichkeiten: Entweder wird freie Phosphorsäure mit dem Fibrin zu Boden geschlagen, oder es tritt anorganische Phosphorsäure bei dem Vorgange des Defibrinierens in organische Bindung über.

Es läßt sich leicht beweisen, daß das letztere der Fall ist, und es ist der Zweck der vorliegenden Arbeit, zu zeigen, wie, inwieweit und unter welchen Umständen ein Übergang von anorganischer Phosphorsäure in organische vor sich geht bzw. der umgekehrte Fall eintritt.

Methodisches.

Das zu den vorliegenden Untersuchungen verwandte Blut wurde stets durch Punktion der Armvene mit ziemlich dicken Kanülen gewonnen, so daß das Blut meist im Strahl in das untergehaltene Gefäß einfloß. In der Regel erfolgte die Blutentnahme vor dem zweiten Frühstück der Patienten. Alle Phosphorsäurebestimmungen dieser Arbeit wurden nach der von *Embden*[1]) angegebenen gravimetrischen Bestimmungsmethode für kleinere Phosphorsäuremengen ausgeführt. Die Enteiweißung erfolgte nach *Schenck* in salzsaurer Lösung mit Sublimat.

Zu jeder einzelnen Bestimmung dienten 15 ccm Blut, das, falls es sich um noch ungeronnenes Blut handelte, roh mit dem Maßzylinder abgemessen und dessen Gewicht dann nach Eintragen in vorgewogene Gefäße genau ermittelt wurde. Kam das Blut nach der Defibrinierung zur Untersuchung, so wurden stets mit der Pipette 15 ccm abgemessen und dann ebenfalls zur Wägung gebracht, so daß alle angegebenen Zahlen auf Gewichtsprozente bezogen sind. Die einzige Ausnahme hiervon machen die Versuche in Abschnitt VII, in dem die im Blute sowohl wie im Serum erfolgten Bestimmungen als Volumprozente angegeben sind.

---

[1]) *G. Embden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **113**, 138, 1921.

Im einzelnen war der Analysengang folgender: 15 ccm Blut wurden mit der doppelten Menge 3proz. Salzsäure versetzt bzw. in die doppelte Menge 3proz. Salzsäure eingetragen, wodurch sofort vollständige Hämolyse eintritt und fermentative Vorgänge ausgeschaltet werden. Dann wurden 15 oder 20 ccm Wasser hinzugefügt und darauf das Eiweiß mit 30 ccm 5proz. Sublimatlösung ausgefällt.

Die weitere Verarbeitung geschah stets erst am folgenden Tage: Der Eiweißniederschlag wurde abgenutscht, das überschüssige Quecksilber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff ausgefällt, der überschüssige Schwefelwasserstoff im Luftstrom verjagt. Sodann wurden 60 ccm dieses Filtrats in der von *Embden* (l. c.) angegebenen Weise nach sorgfältiger Neutralisierung mit Ammoniak mit der salpetersauren Stychninmolybdänlösung versetzt, der entstehende Niederschlag der komplexen Phosphorsäure-Molybdän-Strychninverbindung in Goochtiegeln zur Wägung gebracht und auf Milligrammprozente Phosphorsäure umgerechnet.

I. Freie Phosphorsäure des (venösen) Blutes.

Ehe wir nun auf die Veränderungen des Gehaltes an freier Phosphorsäure im Blute eingehen, seien kurz die absoluten Werte der im venösen Blute gefundenen anorganischen Phosphorsäure für sich betrachtet.

Sie sind in den Tabellen I und II zusammengestellt und schwanken zwischen höchstens 18,15 mg-Proz. (Versuch 37, Tabelle II) bei einer chronischen Glomerulonephritis mit Stickstoff- und Indikanretention und 7,81 mg-Proz. bei einer benignen Sklerose (Versuch 8, Tabelle I).

Der mittlere Wert liegt zwischen 12 und 13 mg-Proz. freier Phosphorsäure, wobei allerdings hervorgehoben sei, daß die Versuchspersonen nicht nüchtern waren.

Tabelle I. Freie Phosphorsäure im (venösen) Blute.

1	2	3	4	1	2	3	4
Nr.	Diagnose	A vor der Gerinnung mg-Proz.	B n. Defibrinieren mg-Proz.	Nr.	Diagnose	A vor der Gerinnung mg-Proz.	B n. Defibrinieren mg-Proz.
1	♂ Diabetes mell. . .	10,76	—	17	♂ Diabetes mell. . .	11,59	—
2	♀ Rheumat. Beschw.	14,41	14,43	18	♂ Hypochondr. Neurose	—	8,85
3	♂ Neuritis	12,24	12,12	19	♀ Gelenkrheumatism.	15,80	13,97
4	♂ Prostatahypertrophie	13,34	12,98	20	♀ Gesund	—	8,59
5	♂ Gesund	14,22	13,87	21	♂ Grippe	—	8,97
6	♂ Magenneurose . .	13,57	12,23	22	♂ Hypertonie . . .	—	12,84
7	♂ Rheumat. Beschw.	10,28	9,39	23	♂ Hypertonie . . .	—	11,17
8	♂ Nierensklerose ben.	7,81	6,49	24	♀ Scabies	—	12,81
9	♂ Hypertonie . . .	9,59	9,49	25	♀ Cystitis	17,07	—
10	♀ Tonsillarabszeß .	13,16	—	26	♂ Neurasthenie . . .	13,97	—
11	♂ Nephrose	—	15,95	27	♀ Gesund	14,44	—
12	♀ Cholecystitis . . .	—	11,73	28	♀ Hypertonie. . . .	14,95	—
13	♂ Gesund	—	12,62	29	♂ Asthma bronch. .	13,24	12,36
14	♂ Hyperacidität d. M.	—	11,11	30	♂ Hypertonie . . .	11,83	11,25
15	♀ Magenneurose . .	—	9,22	31	♀ Hypertonie . . .	15,73	14,06
16	♀ Gesund	15,20	—	32	♂ Tibialislähmung .	12,45	12,06

Die von mir gefundenen Zahlen für freie Phosphorsäure liegen erheblich tiefer als die von *Feigl*[1]) ermittelten. Doch dürften die *Feigl*schen Werte zu hoch sein, da er das Blut vor der Enteiweißung durch Eintragen in destilliertes Wasser hämolysierte und 20 Minuten bei 45° stehen ließ, ein Vorgang, durch den, wie später gezeigt werden wird, große Mengen organischer Phosphorsäure in freie Phosphorsäure übergehen.

Tabelle II.

Abnahme der freien Phosphorsäure beim Stehen des Blutes.

1	2	3	4	5	6
Nr.	Diagnose	A vor der Gerinnung mg-Proz.	B nach Stehen mit Fibrin mg-Proz.	C nach Stehen ohne Fibrin mg-Proz.	Bemerkungen
33	♀ Diabetes mell. . .	13,36	11,82	—	B 1 Std. bei 36—37°
34	♂ Subacidität d. M. .	12,56	12,34	—	B 1 „ „ 36—37°
35	♀ Neurasthenie . . .	13,35	12,10	—	B 1 „ „ 36—37°
36	♀ Cystitis	12,72	11,19	10,15	B u. C 1 „ „ 36—37°
37	♀ Chron. Glomerulonephritis	18,15	16,39	15,43	B 1 „ „ 36—37°
38	♀ Herzneurose . . .	13,48	13,05	—	B 1 „ „ 36—37°
39	♀ Icterus, Cholelithiasis	11,08	9,91	9,78	B u. C 1 „ „ 36—37°
40	♀ Chron. Bronchitis	14,50	14,66	—	B 2 „ „ 36—37°
41	♀ Icterus katarrh. .	11,44	11,21	—	B 2 „ „ 36—37°
42	♂ Gesund	13,86	7,92	—	B 18 „ „ 18°
		—	10,07	—	B 30 „ „ 18°
43	♂ Gesund	15,82	9,69	—	B 18 „ „ 18°
		—	10,56	—	B 30 „ „ 18°

Die freie Phosphorsäure des Blutes zeigt dieselbe individuelle Schwankung wie diejenige des Serums, die im Gegensatz zu der des Gesamtblutes sehr vielmehr Gegenstand der Untersuchung gewesen ist[2]). Auch scheinen die Werte im Gesamtblute kaum wesentlich von denen des Serums abzuweichen, wie das im einzelnen aus weiter hinten mitgeteilten eigenen Untersuchungen ebenfalls deutlich hervorgeht[3]).

II. Änderung der freien Phosphorsäure beim Stehen des Blutes.

Vergleichen wir nun auf Tabelle I die für freie Phosphorsäure gewonnenen Zahlen in Spalte 3 mit denen der Spalte 4. Im ersteren Falle (A) wurde das Blut unmittelbar nach der Entnahme, noch ehe Gerinnung eingetreten war, in Salzsäure eingetragen. Im anderen Falle (B) erfolgte die Versetzung mit Salzsäure erst, nachdem das Blut durch Schlagen mit dem Glasstabe defibriniert und durch Kolieren von größeren Fibrinflocken

[1]) *J. Feigl*, diese Zeitschr. **94**, 304, 1919.

[2]) *I. Greenwald*, Journ. of biol. Chem. **14**, 369, 1913; *J. Feigl*, diese Zeitschr. **112**, 27, 1920; *W. MacKin Marriot* und *F. H. Haessler*, Journ. of biol. Chem. **82**, 241; *W. Denis* und *A. S. Minot*, Arch. of Intern. Med. **26**, 99, 1920.

[3]) Siehe S. 362.

befreit worden war, welcher Vorgang gewöhnlich 10 Minuten bis eine halbe Stunde in Anspruch nahm.

Außer in Versuch 2, in dem die Zahlen praktisch gleich sind, finden wir die B-Werte überall niedriger als die A-Werte.

Zum Teil sind die Unterschiede nur gering (Versuch 3 bis 5, 9, 32), zum Teil sind sie jedoch recht beträchtlich (Versuche 6, 8, 19, 31).

Daß es sich bei dem Verschwinden anorganischer Phosphorsäure tatsächlich um eine Synthese zu organischer Phosphorsäure handelt, geht außer aus allen folgenden Versuchen aus denen der Tabelle II hervor, bei welchen die A-Werte, entsprechend den A-Werten der Tabelle I, durch Eintragen des noch ungeronnenen Blutes sofort nach der Entnahme in Salzsäure gewonnen wurden. Im zweiten Falle (B-Werte, Spalte 4) wurde die gleiche Menge Blut ebenfalls vor der Gerinnung in ein mit Glasperlen beschicktes Erlenmeyerkölbchen gebracht und bis zum sicheren Ende des Gerinnungsvorganges vorsichtig geschüttelt. Dann wurden die mit den Fibrinflocken durchsetzten Proben in den Versuchen 33 bis 39 für eine, in den Versuchen 40 und 41 für 2 Stunden in ein Wasserbad von 36 bis 37° gebracht. Dabei waren die Gefäße zugestöpselt und vollständig bis zum Stopfen in das Wasserbad versenkt, um eventuelle Hämolyse durch Kondenswasserrückfluß zu verhindern.

In den Versuchen 44 und 45 wurde die Schenckfällung der B-Werte erst nach 18- bzw. 30stündigem Stehen bei Zimmertemperatur (18°) vorgenommen.

Spalte 5 der Tabelle II zeigt schließlich drei Versuche, in denen das Blut nach Entfernen des Fibrins für die gleiche Zeit dem gleichen Wasserbade ausgesetzt war, wie bei den entsprechenden Versuchen der Spalte 4.

Wie aus einem Vergleich der Spalten 3 und 4 der Tabelle II hervorgeht, werden auch, wenn man das Fibrin im Blute beläßt, die Werte für anorganische Phosphorsäure nach dem Stehen des Blutes kleiner. *Es muß also eine Synthese freier zu organisch gebundener Phosphorsäure eingetreten sein.*

Die Syntheseperiode scheint bei Körpertemperatur nur eine kurze Dauer zu haben, denn nach nur einstündigem Stehen bei 36 bis 37° (Versuch 33 bis 39) zeigt sich durchweg eine größere Abnahme freier Phosphorsäure, während die Unterschiede sich bereits wieder verwischen, wenn das fibrinhaltige Blut 2 Stunden der gleichen Temperatur ausgesetzt war (Versuche 40 und 41), das heißt, es scheint bei Körpertemperatur in dem mit Fibrinflocken durchsetzten Blute offenbar schon sehr schnell eine die Synthese hemmende Schädigung einzutreten, worauf auch der Umstand hinweist, daß die Abnahme freier Phosphorsäure in dem vom Fibrin befreiten Blute in allen drei Fällen unter den gleichen Umständen eine größere ist (s. Spalte 4 und 5, Versuche 36, 37 und 39). Allerdings muß hier die Möglichkeit offen gelassen werden, daß doch mit dem Fibrin ein Teil der freien Phosphorsäure entfernt wurde.

Bei Zimmertemperatur (s. Versuche 42 und 43) hält die Synthese viel länger an und führt infolgedessen zu bedeutend höheren Werten, so daß nach 18stündigem Stehen die freie Phosphorsäure von 13,9 auf 7,9 bzw. von 15,8 auf 9,7 mg-Proz. zurückgegangen ist. Dann aber tritt auch hier eine Schädigung der Synthesefähigkeit ein, und die Werte nehmen allmählich wieder zu.

Die Frage, ob die Synthese hierbei ganz aufhört oder nur von Spaltungsvorgängen überwuchert wird, muß vorläufig offen gelassen werden.

Bei der einmal eingetretenen Schädigung des Fermentapparates des Blutes gewinnen bald die spaltenden Tendenzen schrankenlose Oberherrschaft, die freie Phosphorsäure des Blutes nimmt schließlich rapide zu, wie weitere, auf der Tabelle nicht aufgeführte Versuche zeigten, so daß für anorganische Phosphorsäure Werte entstehen, die ein Mehrfaches der sofort vorhandenen Menge betragen.

Bevor ich nun weitere Versuche anstelle, schien es mir wichtig, zunächst Aufschluß über die optimale Synthesetemperatur zu erhalten. Bei niedrigen Wärmegraden geht der Übergang in organische Phosphorsäure nur langsam vor sich, bei Körpertemperatur wird die Reaktion beschleunigt, bei höheren Temperaturen findet eine Synthese überhaupt nicht mehr statt.

Das zeigen Versuche der Tabelle III, in denen defibriniertes Blut einmal bei Körpertemperatur und das andere Mal bei 44 bis 45° exponiert wurde.

Tabelle III.

Freie Phosphorsäure des Blutes nach Stehen bei verschiedenen Temperaturen.

Nr.	1	2	3	4	5	6
	Sofort nach Entnahme, vor der Gerinnung	Nach Defibrinieren und Kolieren	Nach Stehen des defibrinierten Blutes			
			bei 36—37°		bei 44—45°	
			1 Std.	2 Std.	1 Std.	2 Std.
	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.
2	14,41	14,13	13,79	12,03	15,33	16,16
3	12,24	12,12	11,17	10,48	13,54	15,80
4	13,34	12,98	11,16	10,07	13,74	15,70

Im ersteren Falle (s. Spalten 3 und 4 der Tabelle III) sehen wir eine kontinuierliche Abnahme der freien Phosphorsäure. Hierbei zeigt sich, wie bereits angedeutet, daß das vom Fibrin befreite Blut seine Fähigkeit zur Synthese länger zu behalten scheint, denn in keinem der Fälle ist nach zweistündigem Stehen ein Sinken der Synthesekraft zu bemerken. Dagegen überwiegen bei einer Temperatur von 44 bis 45° (s. Spalten 5 und 6) sofort die spaltenden Tendenzen, und es findet scheinbar von vornherein eine Zunahme freier Phosphorsäure statt.

Im folgenden wurde daher stets eine Versuchstemperatur von 36 bis 37° zugrunde gelegt.

III. Einfluß der Kohlensäure.

Es lag nahe, die Ursache der Synthesetendenz bei dem Defibrinierungsvorgange und dem Stehen des Blutes in einem Verluste an Kohlensäure zu sehen und demgemäß zu versuchen, ob nicht durch Austreibung der Kohlensäure eine größere Vermehrung der organischen Phosphorsäure zu erzielen sei.

Das war in der Tat der Fall, und umgekehrt führte Erhöhung der CO_2-Spannung zu vermehrter Phosphorsäurespaltung.

Die diesbezüglichen Versuche sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Freie Phosphorsäure des Blutes nach Durchleiten von Luft bzw. Kohlensäure.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Sofort nach der Entnahme	Nach Defibrinieren und Kolieren	Nach einfachem Stehen 1 Std.	Nach Luft durchleiten 1 Std.	Nach Wasserstoff durchleiten 1 Std.	Nach Kohlensäure durchleiten 1 Std.	Nach Luft durchleiten 2 Std.	Nach Kohlensäure durchleiten 2 Std.	Erst Luft, dann Kohlensäure je 1 Std.	Erst Kohlensäure, dann Luft je 1 Std.
	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.
4	13,34	12,98	11,16	9,60	9,31	16,21	—	—	—	—
5	14,22	13,87	—	10,09	10,31	19,06	8,71	24,62	14,52	15,87
6	13,57	12,23	—	8,96	8,74	17,98	7,35	—	15,22	13,94
7	10,28	9,39	7,45	6,73	6,04	13,87	5,39	19,04	10,30	11,61
8	7,81	6,49	—	5,34	5,02	—	—	—	—	—
	—	—	40′	40′	40′	30′	60′	—	—	je 30′
9	9,57	9,49	8,90	8,00	7,41	10,69	6,29	—	—	9,41

Die Versuchsanordnung war folgende:

In 100-ccm-Erlenmeyerkölbchen wurden je 15 ccm Blut eingetragen, die Kölbchen sodann tief in ein Wasserbad von 36 bis 37° versenkt.

In eines derselben wurde nun reiner Wasserstoff eingeleitet (Spalte 5 der Tabelle IV).

Weitere Proben (Spalte 4 und 7) wurden mit Luft durchperlt, die vorher durch Chromschwefelsäure gereinigt und durch mehrmaliges Durchleiten durch Kalilauge kohlensäurefrei gemacht worden war.

Spalten 6 und 8 zeigen Versuche, in denen durch das Blut 1 bzw. 2 Stunden lang Kohlensäure geleitet war, die in einem *Kipp*schen Apparat aus reinen Reagenzien entwickelt wurde.

Die Durchperlung mit den Gasen wurde so reguliert, daß etwa sekundlich eine Gasblase durch das jeweilige Waschgefäß hindurchtrat.

Wie ein Vergleich der Spalten 4 und 5 der Tabelle IV ergibt, ist es völlig irrelevant, ob Wasserstoff oder Luft durchgeleitet wird. In beiden Fällen erfolgt eine weitgehende Synthese anorganischer Phosphorsäure, die etwa doppelt so groß ist als diejenige, welche beim gleichlangen Stehen des Blutes (s. Spalte 3) unter sonst gleichen Umständen eintritt.

Nach zweistündigem Einleiten von Luft (Spalte 7) gehen die Werte für freie Phosphorsäure fast auf die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Mengen (Spalten 1 und 2) zurück.

Umgekehrt tritt beim Einleiten von Kohlensäure (Spalten 6 und 8) eine kontinuierliche Spaltung organischer Phosphorsäure ein, die nach einer Stunde zur etwa anderthalbfachen, nach 2 Stunden zur etwa doppelten Menge freier Phosphorsäure führt.

Spalten 9 und 10 zeigen, daß beide Vorgänge mehr oder weniger reversibel sind, daß einmal nach Einleiten von Luft die eingetretene Synthese durch Kohlensäureeinleitung wieder aufgehoben werden kann; daß es gelingt, nach Durchleiten von Kohlensäure einen Teil der gespaltenen Phosphorsäure durch Luftdurchblasen in organische Bindung zurückzuführen. Hierbei zeigt sich, daß Durchleiten von Kohlensäure stärker spaltend als Austreiben derselben synthetisierend wirkt.

Im ganzen betrachtet, gehen, worauf später noch zurückzukommen sein wird, die Reaktionen offenbar sehr langsam vor sich; es zeigte sich dies besonders bei Vorversuchen, in denen die Kohlensäureeinleitung schon nach wenigen Minuten unterbrochen wurde.

Weiterhin wird durch diese Versuche sehr wahrscheinlich, daß im strömenden arteriellen Blute weniger freie Phosphorsäure vorhanden ist als im venösen. Untersuchungen darüber sind im Gange.

IV. Einfluß von Alkali.

Die Tatsache, daß einerseits Wasserstoff- und Sauerstoffdurchleitung in gleicher Weise die Synthese begünstigen, andererseits Kohlensäuredurchleitung zu vermehrter Phosphorsäurespaltung führt, drängt zu der Annahme, daß lediglich der Kohlensäuregehalt des Blutes maßgebend für die Einstellung des Phosphorsäuregleichgewichtes sei, und es fragt sich weiterhin, ob die Vermehrung des Bicarbonations als solchen zu vermehrtem Übergang organischer Phosphorsäure in anorganische führt, oder ob die durch Einleitung der Kohlensäure hervorgerufene Vermehrung der sauren Valenzen als eigentliche Ursache der Phosphorsäurespaltung anzusehen ist.

Ist letzteres der Fall, so muß Zuführung von Alkali vermehrte Phosphorsäuresynthese zur Folge haben.

In Tabelle V sind vier Versuche zusammengestellt, die zeigen, daß nach Zusatz von 0,1 g Natriumbicarbonat zu 15 ccm Blut die Synthese beim Stehen in der Tat gewaltig gesteigert wird, wie dies am deutlichsten aus den Spalten 4 und 5 der Tabelle V hervorgeht, in denen die jeweilige synthetisierte Phosphorsäuremenge errechnet ist.

In dem Bicarbonatblut (zweimal, Versuche 2 und 8, wurde durch den Zusatz geringe Hämolyse verursacht) wurde unter sonst gleichen Bedingungen nahezu doppelt soviel anorganische Phosphorsäure in organische Bindung übergeführt.

Tabelle V.

Freie Phosphorsäure des Blutes nach Stehen mit Bicarbonat bei 36 bis 37°.

Nr.	1 Nach Defibrinierung und Kolieren mg-Proz.	2 Nach einfachem Stehen mg-Proz.	3 Nach Stehen mit Bicarbonat mg-Proz.	4 Phosphorsäuresynthese ohne Bicarbonat mg-Proz.	5 Phosphorsäuresynthese mit Bicarbonat mg-Proz.	6 Dauer der Exposition
2	14,43	12,03	10,12	2,40	4,31	2 Std.
3	12,12	10,48	7,94	1,64	4,18	2 „
4	12,98	10,07	8,38	2,91	4,60	2 „
8	6,49	5,13	4,40	1,36	2,05	1 Std.

Von großem Interesse erscheint die Frage, inwieweit bei gleichbleibender aktueller H-Ionenkonzentration schon diese Phosphorsäureverschiebungen durch kleinere Säure- und Alkalimengen herbeigeführt werden, und es soll in einer folgenden Arbeit über diese Beziehungen der Kohlensäurespannung zur Phosphorsäuresynthese bzw. Spaltung berichtet werden.

Anhangsweise sei an dieser Stelle bemerkt, daß auch andere Säuren in schwacher Konzentration dem Blute zugesetzt zur Phosphorsäurespaltung führen. Doch sind diese Versuche nicht eindeutig, da, wie wir

bereits angedeutet haben und wie sich später noch mehrfach zeigen wird, jede Schädigung des Blutes die Synthese stört und zu vermehrter Spaltung Veranlassung gibt, vielleicht durch eine größere Empfindlichkeit des die Synthese bewerkstelligenden Fermentes. Geht die Ansäuerung über einen gewissen Grad hinaus, dann wird auch das spaltende Ferment in seiner Wirkung gelähmt, und es treten keine merklichen Veränderungen des Gehaltes an freier Phosphorsäure mehr auf.

V. Andere Anionen: Chlorid, Phosphat.

Bevor wir den Einfluß anderer Ionen auf die Einstellung des Phosphorsäuregleichgewichts betrachten, seien einige Worte über den Ort der Umwandlung vorangestellt.

Synthese sowohl wie Spaltung spielen sich mit allergrößter Wahrscheinlichkeit in den Körperchen ab. Dafür spricht einmal die Tatsache, daß isoliertes Serum seinen Gehalt an freier Phosphorsäure dauernd unverändert beibehält; einerlei, ob Sauerstoff oder Kohlensäure durchgeleitet wird, ob man das Serum einfach stehen läßt oder mit Bicarbonat versetzt, immer bleibt der Wert für freie Phosphorsäure absolut der gleiche. Ferner ist, wie sich später zeigen wird, diejenige organische Phosphorsäurefraktion, durch deren Spaltung die anorganische Phosphorsäure entsteht, im Serum nur in sehr geringer Menge vorhanden. Schließlich ist der Umstand in diesem Sinne zu deuten, daß die Kationen, denen nach *Köppe*[1]) der Eintritt in die Körperchen versagt ist, so lange ohne Wirkung bleiben, als die Blutkörperchenmembran intakt ist.

In Verbindung nun der Annahme, daß Synthese und Spaltung der Phosphorsäure sich in den Körperchen vollziehen, mit der Tatsache, daß den Anionen der Weg in die Körperchen freisteht, während er den Kationen scheinbar verschlossen ist, schien es möglich, den Einfluß des Chlorions in der Weise zu prüfen, daß man Blut einmal mit isotonischer Chloridlösung einwertiger Kationen und zweitens mit ebenfalls isotonischer Lösung eines mehrwertigen Kationchlorids versetzt. Das letztere bedeutet bei Verwendung solcher isotonischer Lösungen eine Anreicherung mit Chlorid.

Es galt zunächst, den Einfluß der Ringerlösung zu prüfen; es wurde folgende Zusammenstellung gewählt: 0,9 Proz. Natriumchlorid, 0,06 Proz. Kaliumchlorid, 0,03 Proz. Calciumchlorid, 0,02 Proz. Natriumbicarbonat, und der Gefrierpunkt auf – 0,56 genau eingestellt. Ebenso wurden die Kaliumchlorid- und Calciumchloridlösungen mit großer Sorgfalt auf den gleichen Gefrierpunkt gebracht.

Es zeigt sich nun, daß bei Zusatz von 15 ccm der gewählten Ringerlösung zu 15 ccm Blut bereits die Fähigkeit zur Synthese sehr stark leidet (s. Tabelle VI, Spalten 1, 2 und 3).

Während Spalte 2 die deutliche Abnahme der freien Phosphorsäuren nach einstündigem Stehen des Blutes zeigt, finden in dem mit gleichen Teilen Ringerlösung verdünnten Blute, das nach der einstündigen Exposition keine Spur von Hämolyse aufwies, diese Abnahme nicht oder nur in viel geringerem Maße.

In Vorversuchen zeigte sich, daß Zusatz von 2 ccm dieser Ringerlösung zu 15 ccm Blut noch keinerlei Einfluß ausübt, daß aber bereits bei Zusatz von 5 ccm Ringerlösung eine geringe Lähmung der Synthese statthat.

---

[1]) *Köppe*, Pflügers Arch. 67, 189, 1897.

Tabelle VI.

Einfluß von Anionen auf die freie Phosphorsäure des Blutes, 2 bis 11, 1 Stunde bei 36 bis 37°.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nr.	Vorher mg-Proz.	Ohne Zusatz mg-Proz.	+ Ringer mg-Proz.	+ KCl mg-Proz.	+ $CaCl_2$ mg-Proz.	+ Ringer mit 2 mg-Proz. prim. Phosphat mg-Proz.	+ Ringer mit 2 mg-Proz. sek. Phosphat mg-Proz.	+ Ringer mit 19 mg-Proz. prim. Phosphat mg-Proz.	+ Ringer mit 19 mg-Proz. sek. Phosphat mg-Proz.	+ Ringer m. 0,12 mg-Proz. Glucose mg-Proz.	+ Ringer m. 0,24 mg-Proz. Glucose mg-Proz.
11	15,95	14,67	16,36	16,15	17,32	—	—	—	—	—	—
12	11,73	10,14	11,18	11,21	13,14	9,73	9,42	—	—	10,52	—
13	12,62	11,62	13,03	13,00	14,99	12,24	11,93	3,89	3,47	12,72	12,79
14	11,11	8,29	10,45	10,49	12,28	9,56	9,63	2,13	1,79	—	—
15	9,22	—	9,26	—	—	8,77	8,60	0,01	0,00	—	—
							8,19*)	—	0,02*)	—	—

*) + Glucose 0,14 Proz.

Völlig irrelevant aber ist es, ob man die gleiche Menge Ringer-, also in der Hauptsache Natriumchlorid-, oder Kaliumchloridlösung zufügt (vgl. Spalten 3 und 4 der Tabelle VI).

Dagegen setzt beim Zusatz der Calciumchloridlösung durchgehend eine erhöhte Spaltung organischer Phosphorsäure ein, wie sich aus einem Vergleich der Spalten 3 und 4 einerseits mit der Spalte 5 deutlich ergibt.

Da, wie schon gesagt, der Unterschied zwischen der zugesetzten Ringer- bzw. Kaliumchloridlösung einerseits und der Calciumchloridlösung andererseits nicht nur qualitativ in den Kationen besteht, die in diesem Falle keine Wirkung ausüben können, sondern auch ein quantitativer in dem Anion Chlorid ist, derart, daß Zufügen der Calciumchloridlösung gleichzeitig eine Anreicherung mit Chlorid bedeutet, so muß eben dieser Anreicherung mit Chloridionen die erhöhte Spaltung der Phosphorsäure zugeschrieben werden.

Umgekehrt sehen wir, daß Vermehrung der Phosphationen in hohem Maße die Tendenz zur *Synthese* vermehrt (vgl. Spalten 6 bis 9 mit Spalte 3 der Tabelle VI).

Die Versuche mit Phosphatzusatz wurden mit primärem und sekundärem Phosphat getrennt und in je zwei verschiedenen Konzentrationen angestellt. Im ersteren Falle (Spalten 6 und 7) wurden der Ringerlösung etwa 2 mg-Proz. berechnet als H_3PO_4 zugesetzt. Im zweiten Falle, Spalten 8 und 9, wurde etwa die zehnfache Menge, 19 mg-Proz., gewählt und die Isotonie sorgfältig aufrecht erhalten.

Großer Wert wurde auch darauf gelegt, daß die Menge des zugesetzten Phosphats in den Spalten 6 und 7 bzw. 8 und 9 stets die gleiche war.

Der Gehalt der Lösungen an H_3PO_4 wurde durch Analysen wiederholt kontrolliert, und die in den Spalten 6 bis 9 aufgeführten Zahlen verstehen sich *nach Abzug der zugesetzten Phosphatmengen.* Vergleichen wir nun die Werte in Spalten 6 und 7 mit denen der Spalten 2 und 3, so zeigt sich, daß durch den Phosphatzusatz, der etwa einem Fünftel der durchschnittlich im Serum vorhandenen Menge entspricht, bereits deutlich eine Steigerung

der Synthese in Erscheinung tritt; im ersten Falle, Versuch 12, ist die Synthese in der Phosphatringerlösung sogar größer als die im unverdünnten Blute.

Vermehrt man den Gehalt an freier Phosphorsäure in der Ringerlösung (s. Versuche in den Spalten 8 und 9, in denen die zugesetzte Lösung etwa doppelt soviel freies Phosphat enthielt wie das Serum), so treten sehr große Mengen anorganischer Phosphorsäure in organische Bindung über. So wurde in Versuch 15 Phosphorsäure in einer Menge synthetisiert, die der ganzen ursprünglich vorhandene Menge entsprach; und in den beiden anderen Versuchen 14 und 15 ist die Phosphorsäuresynthese nur wenig geringer.

Auffällig klein sind die Unterschiede zwischen primärem und sekundärem Phosphat. Vergleicht man die Werte in Spalten 6 und 7 miteinander, und die in Spalte 8 und 9, so sieht man, daß die Synthese in dem mit der gleichen Menge sauren Phosphats versetzten Blut regelmäßig um ein ganz geringes kleiner ist. Dabei ist allerdings zu bemerken, daß der Phosphatzusatz zu der bicarbonathaltigen Ringerlösung erfolgte und Unterschiede in der Reaktion der schwachen Lösungen kaum zu erkennen waren. Dagegen reagierte die konzentriertere Lösung des primären Salzes deutlich lackmussauer, trotzdem aber sind die Unterschiede in der Synthese kaum größer!

Schließlich seien noch Versuche angeführt, in denen aus Gründen, auf die ich später erst eingehen möchte, der Ringerlösung Traubenzucker zugesetzt war. Bei den Versuchen in Spalte 10 betrug dieser Zusatz 0,12 Proz., in Spalte 11 wurde in Versuch 13 die doppelte Menge hinzugegeben. In Versuch 15 wurde den sekundären Phosphatlösungen ebenfalls noch Glucose, und zwar 0,14 Proz., zugesetzt. Die durch Phosphat-Glucose-Ringer erzielten Werte sind mit einem *) bezeichnet.

Es zeigt sich, daß der Zusatz von Glucose keinen erkennbaren Einfluß auf die Phosphorsäuresynthese ausübt.

Es erübrigt sich zu sagen, daß in keinem der Versuche durch die zugesetzten Lösungen auch nur eine Spur von Hämolyse eintrat.

Des ferneren geht aus diesen Untersuchungen die auch schon von anderer Seite beobachtete Tatsache hervor, daß Ringerlösung keineswegs eine indifferente Flüssigkeit bedeutet. Es erscheint jedoch möglich, durch Zusatz geeigneter Phosphatmengen eine Lösung herzustellen, die gerade die spaltungsvermehrende Schädigung durch die Verdünnung durch die synthesebegünstigende Wirkung des Phosphats auszugleichen imstande ist. Die Frage aber, ob bei Zusatz dieser Phosphatringerlösung schließlich genau die gleichen Phosphorsäureverbindungen resultieren wie beim Stehen des unverdünnten Blutes, muß offen gelassen werden.

VI. Hämolyse, Kationen.

Macht man das Blut hämolytisch, indem man dasselbe in destilliertes Wasser einträgt, so scheint durch die Schädigung die Fähigkeit zur Phosphorsäuresynthese vollkommen verloren zu gehen, es tritt nämlich dann zunächst sehr schnell, späterhin langsamer eine irreversible Spaltung organischer Phosphorsäure ein, so daß (s. Tabelle VII) nach zweistündigem Stehen die Zahlen für freie Phosphorsäure auf etwa das Doppelte bis Dreifache des Ausgangswertes ansteigen; nach vierstündigem Stehen waren sie auf über das Dreifache gestiegen; nach 6 Stunden wurde ein Wert beobachtet, der annähernd das Vierfache der vorher vorhandenen Menge betrug.

Tabelle VII.

Phosphorsäurespaltung durch Hämolyse.

Nr.	1	2	3	4	5	6	Bemerkungen
	Vorher	Freie Phosphorsäure im hämolytischen Blute nach					
		½ Std. bei 20°	1 Std. bei 36—37°	2 Std. bei 36—37°	4 Std. bei 36—37°	6 Std. bei 36—37°	
	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	mg-Proz.	
16	15,20	19,01	27,63	31,31	—	—	15 Blut + 20 H_2O
39	11,08	—	—	30,98	36,26	41,98	15 Blut + 25 H_2O

An diesem hämolytischen Blute bietet sich nun Gelegenheit, den Einfluß der Kationen kennenzulernen (Tabelle VIII).

Das Blut wurde in den ersten Versuchen der Tabelle VIII in 20 ccm, bei den Versuchen 36 bis 38 in je 27 ccm Wasser eingetragen. Zum Teil wurde hierzu das noch ungeronnene Blut verwandt, zum Teil wurde defibriniertes Blut genommen, wie das im einzelnen aus Spalte 6 der Tabelle VIII hervorgeht.

Nach etwa 20 minutigem Stehen bei Zimmertemperatur wurden die am Kopf der betreffenden Spalte ersichtlichen Zusätze gemacht; und zwar einmal, Spalte 2, wurden 3 ccm Wasser, zu einer anderen Probe (Spalte 3) wurden 3 ccm einer anderthalbfach molaren Kaliumchloridlösung hinzugefügt. In Spalte 4 wurde Natriumchlorid in der gleichen Menge und Konzentration, und schließlich in Spalte 5 Calciumchlorid zugegeben. Von letzterem betrug der Zusatz in den Versuchen 17, 34 bis 36 7 ccm einer anderthalbfach molaren, in den Versuchen 37 und 38 3 ccm einer einfach molaren Lösung.

Tabelle VIII.

Einfluß von Kationen auf die Phosphorsäurespaltung.
Exposition 1 Stunde bei 36 bis 37°.

Nr.	1	2	3	4	5	6
	Vorher mg-Proz.	Wasser mg-Proz.	KCl mg-Proz.	NaCl mg-Proz.	$CaCl_2$ mg-Proz.	Bemerkungen
17	11,59	23,10	24,01	23,89	20,66	15 ccm Blut vor der Gerinnung in 20 H_2O
	—	23,31	24,49	—	20,41	15 „ defibriniertes Blut in 20 H_2O
34	12,56	24,60	26,70	—	21,03	15 „ Blut vor der Gerinnung in 20 H_2O
35	13,35	24,45	26,11	25,29	23,28	15 „ „ „ „ „ „ 20 H_2O
36	12,72	20,20	22,33	21,16	17,31	15 „ defibriniertes Blut in 27 ccm H_2O
37	18,15	23,11	26,36	25,32	21,55	
38	13,48	24,81	26,09	25,16	22,78	

Durch das Hinzufügen der Salzlösungen hellte sich das vorher in der dicken Schicht tiefschwarz aussehende Blut regelmäßig wieder etwas auf, und nach dem Stehen zeigte sich ein Bodensatz von intakten Blutkörperchen. Die Hämolyse war also in keinem Falle eine vollkommene.

Nach den Zusätzen wurden die Proben für eine Stunde einer Temperatur von 36 bis 37° ausgesetzt und sodann die Schenckfällung vorgenommen.

Die Resultate sind aus der Tabelle VIII zu ersehen.

Es zeigt sich zunächst aus einem Vergleich der Spalten 1 und 2 die Größe der durch Hämolyse und Verdünnung hervorgerufenen Phosphorsäurespaltung. Die Werte für freie Phosphorsäure steigen auf das Anderthalb- bis Zweifache des Ausgangswertes.

Aus Spalten 3 und 4 ist ersichtlich, daß diese Spaltung durch Kalium- und Natriumchloridzusatz vermehrt wird, und zwar durch KCl in noch höherem Maße als durch NaCl.

Durch Calciumchlorid hingegen wird die Phosphorsäurespaltung deutlich gehemmt, und wenn man bedenkt, daß bis zu dem Zusatz der Salzlösung während des 20minutigen Stehens schon eine beträchtliche Menge Phosphorsäure abgespalten wird, so ist diese Hemmung durch $CaCl_2$ sogar eine recht beträchtliche.

Diese Wirkung muß mit Sicherheit den *Kationen* zugeschrieben werden; denn einmal finden sich schon deutliche Unterschiede zwischen der KCl- und der NaCl-Lösung bei dem gleichen Chlorionengehalt, und dann müßte im Hinblick auf die Versuche der Tabelle VI mit $CaCl_2$ am intakten Blut die Anreicherung mit Chlorid beim Zufügen der Calciumchloridlösung in der entgegengesetzten Richtung zur Wirkung kommen, wenn nicht das Calcium mehr die Synthese begünstigte als das Chlorid eine Spaltung herbeiführt.

VII. Phosphatwanderung zwischen Körperchen und Serum.

In einem früheren Abschnitte wurde auf die große Wahrscheinlichkeit hingewiesen, daß der Ort der Synthese sowohl als der Spaltung die Blutkörperchen seien, und es läßt sich weiterhin zeigen, daß bei den Vorgängen, die zu vermehrter Synthese führen, also Einleiten von Luft bzw. Stehenlassen des Blutes freie Phosphorsäure nach dem Ort der Synthese hinströmt, d. h. in die Körperchen hineingeht, daß beim Einleiten von Kohlensäure hingegen Phosphorsäure aus den Körperchen ins Serum übertritt.

Derartige Versuche sind auf Tabelle IX zusammengestellt. Die Versuchsanordnung war folgende:

Zu den Versuchen 18 bis 21 wurden etwa je 200 ccm Blut entnommen, möglichst schnell durch Schlagen mit dem Glasstabe defibriniert und in zwei Teile geteilt.

Von der einen Hälfte wurden 15 ccm alsbald zur Bestimmung der freien Phosphorsäure des Gesamtblutes in Salzsäure eingetragen, der Rest wurde zentrifugiert, das klare Serum abgehoben und hierin ebenfalls freie Phosphorsäure, ferner durch Veraschung nach *Neumann* die gesamte Phosphorsäure des Serums und schließlich die Menge der Trockensubstanz bestimmt.

Die andere Hälfte wurde in ein Wasserbad von 36 bis 37° gestellt — die genaue Zeit ist in Spalte 13 ersichtlich —, und in Versuch 18 wurde zudem noch Luft eingeleitet.

Dann wurden an dem so vorbehandelten Gesamtblute und am Serum die gleichen Bestimmungen vorgenommen.

Zum Versuche 22 wurden 300 ccm Blut entnommen, mit 100 alsbald nach dem Defibrinieren die vorgenannten Bestimmungen am Gesamtblut und Serum angesetzt. Der Rest wurde $3/4$ Stunden bei 36 bis 37° exponiert, worauf 100 ccm zu den gleichen Bestimmungen entnommen wurden. In den Rest leitete man für $3/4$ Stunden Kohlensäure ein, worauf dann ebenfalls

wieder die Menge der freien Phosphorsäure im Gesamtblute, freie und Gesamtphosphorsäure im Serum sowie der Trockenrückstand im Serum ermittelt wurden.

In den letzten beiden Versuchen schließlich wurde das Blut in drei Teile geteilt, der eine Teil sofort untersucht, der zweite nach zweistündigem Einleiten von Luft, der dritte nach einstündigem Einleiten von Kohlensäure.

Die Durchperlung mit Luft bzw. mit Kohlensäure erfolgte hierbei wegen der Gefahr der Hämolyse in sehr schwachem Strome.

Die auf der Tabelle IX in dem gleichen Kasten stehenden Zahlen in den Spalten 3, 4, 7, 8, 11 und 12 sind die Ergebnisse von vornherein getrennt angesetzten Doppelbestimmungen.

Bei den Gesamtphosphorsäureanalysen wurde hierbei der höhere Wert als der richtigere zugrunde gelegt.

Tabelle IX.

Phosphatwanderung zwischen Serum und Körperchen..

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	A sofort n. Defibrinieren				B nach Luftdurchleitung				C n. Kohlensäureinleitg.				Versuchstemperatur 36–37°
		Serum				Serum				Serum			
	Gesamtblut. Freie Phosphorsäure mg-Proz.	Freie Phosphorsäure mg-Proz.	Gesamtphosphorsäure mg-Proz.	Trockensubstanz Proz.	Gesamtblut. Freie Phosphorsäure mg-Proz.	Freie Phosphorsäure mg-Proz.	Gesamtphosphorsäure mg-Proz.	Trockensubstanz Proz.	Gesamtblut. Freie Phosphorsäure mg-Proz.	Freie Phosphorsäure mg-Proz.	Gesamtphosphorsäure mg-Proz.	Trockensubstanz Proz.	
18	8,85	8,33	39,83	8,98	6,54	7,02	36,91	9,18	—	—	—	—	B 1 Std. Einleiten von Luft
19	13,97	14,87	52,50 52,38	8,75	11,83	11,95	48,84 48,49	8,74	—	—	—	—	B 2 Std. Stehen
20	8,59	8,87	27,02 26,90	9,32 9,32	6,80	6,85	24,54 24,89	9,29	—	—	—	—	B 1¼ Std. Stehen
21	8,97	8,71	34,83 35,39	9,43 9,39	7,58	7,27	32,70 33,55	9,41 9,39	—	—	—	—	1½ " "
22	12,84	11,57	36,95 37,16	8,40 8,43	12,25	9,93	34,47	8,43 8,40	15,62	10,88	37,16	8,88 8,92	B ¾ " " C erst ¾ Std. Steh., dann ¾ Std. Einleiten von CO_2
23	11,17	9,70	41,06 40,77	8,77 8,83	10,05	7,83	38,01 38,51	8,88 8,89	15,54	12,06	45,16 44,81	9,28 9,17	B 2 Std. Einleiten von Luft C 1 Std. Einleiten von CO_2
24	12,81	12,42	36,95 36,67	9,42 9,40	10,39	9,59	33,48 33,27	9,45 9,46	17,11	14,75	39,57 39,50	9,95 9,96	B 2 Std. Einleiten von Luft C 1 Std. Einleiten von CO_2

Betrachten wir zunächst die Werte für freie Phosphorsäure des Gesamtblutes in den Spalten 1, 5 und 9, so zeigt sich auch hier wieder die absolute Gesetzmäßigkeit, mit der beim Stehen des Blutes oder beim Einleiten von Luft anorganische Phosphorsäure in organische Bindung übergeführt wird, mit der beim Einleiten von Kohlensäure organische Phosphorsäureverbin-

dungen gespalten werden. Stets sind die Werte für freie Phosphorsäure im Gesamtblute nach Stehen geringer, nach Einleiten von Kohlensäure bedeutend größer geworden.

Vergleichen wir nunmehr die Werte des Gesamtblutes mit denen des Serums (Spalten 1 und 2), so zeigt sich, daß diese in vier von den sieben Versuchen (Versuche 18, 20, 21 und 24) einander sehr ähnlich sind. In den anderen drei Versuchen finden sich größere Unterschiede. In einem derselben, bei einer auf Gelenkrheumatismus beruhenden Mitralinsuffizienz (Versuch 20), sind die im Serum gefundenen Werte höher als die im Gesamtblute; in den Versuchen 22 und 23 (zwei Hypertonien) sehen wir umgekehrt im Gesamtblut mehr freie Phosphorsäure als im Serum.

Ob dies letztere eine für diese Erkrankung charakteristische Erscheinung ist oder nur ein zufälliges Zusammentreffen, soll an dieser Stelle nicht erörtert werden.

Bei der Betrachtung der freien Phosphorsäure des Serums vor und nach den am Blute vorgenommenen Eingriffen (Spalten 2, 6 und 10) zeigt sich, daß auch im Serum beim Einleiten von Luft freie Phosphorsäure *ab*-, beim Einleiten von Kohlensäure die freie Phosphorsäure des Serums *zunimmt*. Und zwar entspricht die Abnahme im Serum in ihrer Größe im allgemeinen durchaus der Abnahme im Gesamtblute. Dagegen ist die Zunahme freier Phosphorsäure beim Einleiten von Kohlensäure am Gesamtblute durchweg deutlicher ausgeprägt als am Serum.

Die Abnahme bzw. Zunahme der freien Phosphorsäure im Serum ist jedoch nicht die Folge einer Synthese bzw. einer Spaltung organischer Phosphorsäure im Serum, sondern vielmehr die Folge einer *Wanderung von Phosphorsäure in die Körperchen bzw. aus denselben.*

Dies geht deutlich aus den Spalten 3, 7 und 11 hervor, in welchen die Werte für Gesamtphosphorsäure des Serums vor und nach den Eingriffen am Blut verzeichnet sind. Diese Werte für Gesamtphosphorsäure machen nämlich die gleichen Schwankungen mit. Nach dem Einleiten von Luft bzw. nach dem Stehen des Blutes sehen wir sie in allen Versuchen zu-, nach Einleiten von Kohlensäure abnehmen.

Der besseren Übersichtlichkeit halber ist diese Zu- bzw. Abnahme in besonderen Tabellen dargestellt.

Tabelle X.

Eintritt von Phosphorsäure in die Körperchen bei der Arterialisierung.

Nr.	1	2	Nr.	1	2
	Verminderung des Serums an			Verminderung des Serums an	
	freier Phosphorsäure mg-Proz.	Gesamtphosphorsäure mg-Proz.		freier Phosphorsäure mg-Proz.	Gesamtphosphorsäure mg-Proz.
18	1,31	2,92	22	1,64	2,69
19	2,92	3,66	23	1,87	2,55
20	2,02	2,13	24	2,83	3,47
21	1,44	1,84			

Tabelle X zeigt in Spalte 1 die Verminderung an freier Phosphorsäure, nachdem das Blut unter den bekannten synthesegünstigen Bedingungen gestanden hatte, in Spalte 2 die Menge der in die Körperchen abgewanderten Phosphorsäure.

Die Zahlen in Spalte 1 der Tabelle X sind durch Differenz der Spalten 2 und 6 der Tabelle IX, diejenigen in Spalte 2 der Tabelle X durch Differenz der höheren Werte der Spalten 3 und 7 der Tabelle IX gewonnen.

Die Zahlen in Tabelle X lassen sich am zwanglosesten so deuten, daß beim Durchleiten von Luft durch Blut nicht nur freie anorganische, sondern auch organische Phosphorsäure in die Körperchen eintritt.

Das Umgekehrte zeigt Tabelle XI. (Spalte 1 in Versuch 22 Differenz der Spalten 10 und 6 der Tabelle IX, in Versuch 23 und 24 Differenz der Spalten 10 und 2; Spalte 2 in Versuch 22 Differenz der Spalten 11 und 7 der Tabelle IX, in Versuchen 23 und 24 Differenz der Spalten 11 und 3 der Tabelle IX.)

Und zwar tritt unter diesen Umständen sowohl freie als organische Phosphorsäure aus den Körperchen in das Serum über.

Tabelle XI.

Austritt von Phosphorsäure aus den Körperchen beim Durchleiten von Kohlensäure.

Nr.	1	2
	Zunahme des Serums an	
	freier Phosphorsäure mg-Proz.	Gesamt-phosphorsäure mg-Proz.
22	0,95	2,69
23	2,36	4,10
24	2,33	2,62

Die Zahlen der Tabelle XI erscheinen etwas zu hoch, wenn man die Menge der Trockensubstanzen berücksichtigt (s. Tabelle IX, Spalten 4, 8, 12). Wie man sieht, ändert sich der Trockengehalt des Serums beim Stehen des Blutes bzw. beim Einleiten von Luft so gut wie gar nicht.

Hingegen tritt beim Durchleiten von Kohlensäure die von *Höber* erschlossene und von *v. Limbeck*[1]) beobachtete Eindickung des Serums ein: In unseren Versuchen steigt der Gehalt an Trockensubstanz unter diesen Umständen um etwa 5 bis 6 Proz. an. Die durch diese Eindickung des Serums erfolgte prozentige Zunahme der Phosphorsäure bildet jedoch, wie sich leicht errechnen läßt, nur einen kleinen Teil der in Tabelle XI angegebenen Zahlen, so daß weitaus der größte Teil der Phosphorsäurezunahme im Serum beim Einleiten von Kohlensäure durch Einwanderung aus den Körperchen erklärt werden muß.

Es sei an dieser Stelle an die Versuche von *Iversen*[2]) erinnert, der Blut durch Zusatz von Phosphat unter synthesegünstige Bedingungen brachte und dadurch ebenfalls Phosphorsäure in die Körperchen eintreten sah.

Durch diese Versuche wird ein weiterer Antagonismus zwischen Chlorid und Phosphat offenbar. Wissen wir doch aus den Versuchen von *Zuntz*, *Hamburger* und *v. Limbeck*[3]), daß Chlorid gerade in der entgegengesetzten

[1]) *Höber*, Physik. Chem. der Zelle u. Gew., 5. Aufl., S. 446, 1922.

[2]) *P. Iversen*, diese Zeitschr. **114**, 297, 1921.

[3]) *Zuntz*, Dissertation Bonn 1868; *Hamburger*, Zeitschr. f. Biol. **28**, 405, 1892; Arch. f. Anat. u. Physiol. 1894, S. 419; *v. Limbeck*, Arch. fl. exper. Pathol. **35**, 309, 1895.

Richtung wandert: beim Einleiten von Kohlensäure tritt Chlor in die Blutkörperchen ein, bei der Arterialisierung tritt welches aus, so daß im arteriellen Blutserum stets etwas mehr Chlor nachweisbar ist, als im Serum des venösen Blutes[1]).

VIII. Über die Art der synthetisierten bzw. gespaltenen Phosphorsäure.

Welcher Art ist nun die organische Phosphorsäureverbindung, die bei der Synthese entsteht, bzw. aus welcher bei dem Spaltungsvorgange anorganische Phosphorsäure freigemacht wird? Handelt es sich um eine einheitliche Substanz, oder sind mehrere Phosphorsäureverbindungen bei dieser Synthese beteiligt? Die Tatsache, daß die Phosphorsäure unter den gleichen Umständen in die Körperchen eintritt, unter denen, wie wir wissen, die Blutkörperchenmembran für Traubenzucker durchgängig wird, läßt daran denken, daß beide, die Phosphorsäure und der Traubenzucker, zu einer hexosephosphorsäureartigen Verbindung, ähnlich dem Lactacidogen des Muskels, aufgebaut werden.

Dagegen sprechen aber verschiedene Umstände; einmal die Tatsache, daß die Phosphorsäuresynthese und das Einwandern der Phosphationen sehr langsam vor sich gehen, während der Traubenzucker sehr rasch aus dem Serum verschwindet, sich allerdings erst spät im Innern der Körperchen bemerkbar macht[2]). Ferner würde dagegen anzuführen sein, daß, wie wir bereits gesehen haben, Traubenzuckerzusatz ohne jeden Einfluß auf die Menge der gebildeten Phosphorsäure zu sein scheint.

Sei dem nun wie es sei, wenn eine hexosephosphorsäureartige Verbindung entsteht, so hat diese vielleicht reduzierende Eigenschaften, und es muß möglich sein, diese Reduktion nachzuweisen, wenn es gelingt, die entstandene Verbindung von dem Zucker des Blutes zu trennen.

Bevor ich auf diese Versuche im einzelnen zu sprechen komme, sei zunächst festgestellt, zu welcher Phosphorsäurefraktion die entstandene bzw. gespaltene Phosphorsäureverbindung gehört.

Feigl[3]) und *Greenwald*[4]) haben den Begriff der „säurelöslichen" Phosphorsäure aufgestellt und damit diejenigen Phosphorsäureverbindungen gemeint, die in dem sauren eiweißfreien Blutextrakt, also in dem sauren Schenckfiltrate in Lösung bleiben, im Gegensatz zu jener Phosphorsäure, die an Eiweiß gebunden bei der Enteiweißung ausfällt, und der Lipoidphosphorsäure, die bei dem Enteiweißungsvorgange ebenfalls mit zu Boden gerisssen werden soll (*Feigl*).

Die Bestimmung der säurelöslichen Phosphorsäure geschieht durch Veraschen des sauren Schenckfiltrates.

Tabelle XII zeigt nun eine Reihe von Versuchen, in denen sowohl die freie (Spalten 1 bis 4) als auch die „säurelösliche" Phosphorsäure (Spalten 5 bis 8) bestimmt wurden, und zwar einmal sofort nach der Entnahme in dem noch ungeronnenen Blute (Spalte 1 und 5), fernerhin im defibrinierten Blute alsbald nach dem Defibrinieren (Spalten 2 und 6), drittens nachdem das Blut eine Zeitlang durchlüftet war (Spalten 3 und 7), und schließlich (Spalten 4 und 8) nach Kohlensäuredurchleitung.

---

[1]) *Hamburger*, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1893, S. 157; *van Creveld*, diese Zeitschr. **123**, 304, 1921.

[2]) *R. Ege*, diese Zeitschr. **114**, 108, 1921.

[3]) *J. Feigl*, ebendaselbst **112**, 27, 1920.

[4]) *Greenwald*, Journ. of biol. Chem. **25**, 431, 1916.

Tabelle XII.

Freie und „gesamte säurelösliche“ Phosphorsäure des Blutes.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Freie Phosphorsäure				Gesamte säurelösliche Phosphors.				Dauer der Gasdurchleitung
	A sofort mg-Proz.	nach Defibrinieren B mg-Proz.	nach Einleiten von Luft C mg-Proz.	nach Einleiten von CO_2 D mg-Proz.	A sofort mg-Proz.	nach Defibrinieren B mg-Proz.	nach Einleiten von Luft C mg-Proz.	nach Einleiten von CO_2 D mg-Proz.	
23	—	11,17	10,05	15,54	—	81,00	81,88	81,48	2 Std. Luft, 1 Std. CO_2
24	—	12,81	10,39	17,11	—	83,67	83,84	84,14	
25	17,07	—	9,69	—	82,31	—	82,31	—	2 „ „
26	13,97	—	9,54	17,88	—	—	76,08	75,80	2 „ „ 1 Std. CO_2
27	14,44	—	8,13	24,05	82,61	—	82,61	82,78	2 „ „ 2 „ CO_2
28	14,95	—	9,15	24,54	83,80	—	84,21	86,79	2 „ „ 2 „ CO_2
29	13,24	12,36	7,65	25,05	93,45	94,53	93,99	93,31	2 „ „ 2 „ CO_2
30	11,83	11,25	7,61	20,39	63,32	63,02	63,63	62,92	2 „ „ 2 „ CO_2
31	15,73	14,06	9,09	25,17	82,83	83,30	82,92	83,02	2 „ „ 2 „ CO_2
32	12,45	12,06	7,44	24,93	87,55	86,95	87,55	86,46	2 „ „ 2 „ CO_2
33	13,36	—	7,62	—	79,75	—	78,41	—	2 „ „

Die Zeitdauer der Durchlüftung bzw. der Kohlensäuredurchleitung sind für den jeweiligen Versuch in Spalte 9 angegeben, und es sei weiterhin vermerkt, daß in den Versuchen 25 bis 33 die Gasdurchperlung in ziemlich kräftigem Strome erfolgte, während in den Versuchen 23 und 24 die Gase sehr langsam durchgeleitet wurden.

Bei einer Betrachtung der Spalten 1 bis 4 der Tabelle XII begegnen wir wieder der gleichen Gesetzmäßigkeit: Geringe Abnahme der freien Phosphorsäure durch den Defibrinierungsvorgang, größere Abnahme durch Einleiten von Luft, besonders wenn dies in kräftigem Strome vor sich ging, und noch größere *Zu*nahme der freien Phosphorsäure beim Einleiten von Kohlensäure.

Die Werte in Spalte 5 bis 8 hingegen für die gesamte lösliche Phosphorsäure werden durch keine der am Blute vorgenommenen Prozeduren merklich beeinflußt, wenn wir von Versuch 28, Spalte 8, absehen, in dem als einzigem bei der Kohlensäuredurchleitung aus unbekannten Gründen eine geringe Spaltung auch unlöslicher Phosphorsäure eingetreten ist.

Das heißt also, die Summe der anorganischen und der löslichen organischen Phosphorsäure bleibt konstant; mit anderen Worten, es handelt sich beim Durchlüften um einen Übergang von anorganischer Phosphorsäure in eine säurelösliche organische Form, und beim Einleiten von Kohlensäure um Spaltung einer säurelöslichen Phosphorsäureverbindung.

Diese Tatsache setzt uns in den Stand, der gebildeten bzw. verschwundenen organischen Phosphorsäure weiter nachzugehen.

Es gelingt nämlich durch Neutralisieren des sauren Schenckfiltrates und Versetzen mit Ätzbaryt, eine Methode, die *Embden* zur Isolierung des Lactacidogens benutzte, den größten Teil der Phosphorsäureverbindungen zu Boden zu schlagen; d. h. die anorganische Phosphorsäure fällt quantitativ

mit Baryt, von der organischen fällt ein großer Teil[1]). Es verbleibt ein kleiner barytlöslicher Rest. Aus der Größe dieses barytlöslichen Restes in dem verschieden behandelten Blute läßt sich die Größe der Barytlöslichkeit bzw. die Unlöslichkeit der gebildeten bzw. gespaltenen organischen Phosphorsäure erkennen. Ist diese nämlich von der gleichen Unlöslichkeit wie die Bariumverbindung der anorganischen Phosphorsäure, dann muß in allen Fällen der barytlösliche Rest der gleiche sein.

Entsteht dagegen bei der Synthese eine barytlösliche Phosphorsäureverbindung, dann muß der barytlösliche Rest zunehmen, im durchlüfteten Blut also größer sein; umgekehrt wird eine barytlösliche Phosphorsäure beim Einleiten von Kohlensäure gespalten, dann muß infolge der größeren Anwesenheit anorganischer, also barytunlöslicher Phosphorsäure, in diesem Blute ein kleinerer barytlöslicher Rest verbleiben.

Es erwies sich, wie später zu zeigen sein wird, die in Frage kommende Barytverbindung als recht schwer löslich.

Dadurch war es möglich, dieselbe von dem Blutzucker zu trennen und die Größe ihrer Reduktion zu bestimmen.

Der Versuchsgang war folgender:

Von dem entnommenen Blute wurden vor der Gerinnung etwa 60 ccm in ein vorgewogenes Gefäß mit 180 ccm 2proz. Salzsäure eingetragen und das Gewicht genau festgestellt. Der Rest wurde defibriniert und koliert. Zu den übrigen Ansätzen wurde sodann die gleiche Gewichtsmenge defibrinierten Blutes benutzt. B wurde unmittelbar nach der Defibrinierung, C nach Einleiten von Luft, D nach Einleiten von Kohlensäure mit ebenfalls 180 ccm 2proz. Salzsäure und dann mit 120 ccm 5proz. Sublimatlösung versetzt. Von dem enteiweißten und quecksilberbefreiten Filtrate wurden, wie immer, 60 ccm zur Bestimmung der freien Phosphorsäure, 15 oder 20 zur Bestimmung der gesamten (säurelöslichen) Phosphorsäure benutzt.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der schon besprochenen Tabelle XII niedergelegt.

Der Rest des Schenckfiltrates diente zur Feststellung der Reduktion des Barytniederschlags. Zu diesem Zwecke wurden je 100 ccm Filtrat in Zentrifugengefäße gegeben, die bei 107 ccm eine Marke trugen. Dazu kamen je 2 ccm 33proz. Natronlauge, dann reinster pulverisierter Ätzbaryt. Unter eifrigem Umrühren mit dem Glasstabe wurde allmählich so viel Ätzbaryt eingetragen, als in Lösung ging. Dabei fiel der charakteristische gallertartige Niederschlag aus. Auf dem Flüssigkeitsspiegel bildete sich eine dünne Schicht von Bariumcarbonat. Sodann wurden die Glasstäbe, die zum Umrühren gedient hatten, herausgenommen, abgespritzt, die Gefäße zur Marke aufgefüllt und außer in den Versuchen 25 und 26 für 1 bis 2 Stunden in Eis gestellt. Danach wurde vom Niederschlag abzentrifugiert und dieser zweimal mit etwa 10 ccm eiskaltem Wasser ausgewaschen. 100 ccm des klaren Zentrifugats wurden mit 10 ccm 25proz. Schwefelsäure versetzt, von dem bariumfreien Filtrate 100 ccm zur Bestimmung der barytlöslichen Phosphorsäurefraktion verascht (Tabelle XIII).

Der ausgewaschene Barytniederschlag wurde in 3 ccm 6proz. Salzsäure aufgenommen, in der er sich unter Aufbrausen zum größten Teil, jedoch nicht vollständig löste: es resultierte ein sehr fein verteilter opaker Nieder-

---

[1]) Diese Tatsache wurde in Untersuchungen, die *Embden mit Martin Erich Mayer und mir* während des Jahres 1922 durchführte, festgestellt; ihre Veröffentlichung ist aus äußeren Gründen bisher unterblieben.

schlag. Dann wurde mit 5 ccm Wasser verdünnt und das gesamte Barium durch Zugabe von 2 ccm einer etwa 12proz. Kaliumsulfatlösung als Bariumsulfat zur Ausfällung gebracht.

In dieser Bariumsulfataufschwemmung wurde nun die Reduktion nach *Bang* bestimmt.

Zunächst wurde die noch schwach salzsaure Lösung durch (6 ccm) *Bangs* Alkalilösung neutralisiert; sodann wurden zugefügt: 1. 4 ccm einer 0,2612proz. Kupfersulfatlösung, 2. 4 ccm saure Jodatlösung nach *Bang*, 3. 4 ccm Alkalilösung nach *Bang*. Nach 4,5minutigem Erhitzen im Dampfstrahl, 4. 4 ccm 20proz. Schwefelsäure. Nach 5 bis 10 Minuten langem Stehen geschah die weitere Aufbewahrung bis zur Titration unter Eiskühlung. Unmittelbar vor dieser wurden 1 ccm 5proz. Jodkalilösung und fünf Tropfen Bangstärkelösung zugegeben. Die Titration erfolgte mit n/100 Thiosulfatlösung, die jedesmal aus n/10 Lösung frisch bereitet wurde.

Der Bariumsulfatniederschlag störte bei der Ausführung des Bestimmung, die bis zum Ende in den Zentrifugengefäßen durchgeführt wurde, wie zu erwarten war, nicht im geringsten.

Die Titerstellung erfolgte mit bekannten Glucosemengen.

Ergebnisse.

Zuerst sei Tabelle XIII betrachtet, die die Menge der barytlöslichen Phosphorsäurefraktion in Milligrammen angibt, bezogen auf 100 ccm Blut.

Tabelle XIII.

„Barytlösliche“ Phosphorsäurefraktion des Blutes.

Nr.	1 A sofort mg-Proz.	2 B nach Defibrinieren mg-Proz.	3 C nach Einleiten von Luft mg-Proz.	4 D nach Einleiten von CO_2 mg-Proz.
25	9,73	—	10,36	—
27	8,68	—	8,47	8,33
29	6,85	6,52	7,40	6,44
30	5,40	4,75	5,62	4,18
31	6,84	6,84	8,00	6,70
32	7,31	7,05	8,16	6,55
33	8,74	—	8,80	—

Da zeigt sich denn bei einem Vergleich der Spalten 1 und 3, daß die Barytlöslichkeit etwas zugenommen hat; d. h., daß beim Einleiten von Luft eine Substanz entstanden ist, die nicht ganz so unlöslich ist wie anorganisches Bariumphosphat. Jedoch ist die Zunahme der Barytlöslichkeit so gering, daß der weitaus größte Teil der neu gebildeten Phosphorsäureverbindung sich mit Sicherheit im Barytniederschlag befindet.

Von einem Vergleich der Spalten 4 und 1 gilt vice versa dasselbe. In diesem Falle hat durch die bei der Kohlensäureeinleitung eingetretene Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure die Menge der barytlöslichen Phosphorsäurefraktion etwas abgenommen. Aber auch hier muß gesagt werden, daß der weitaus größte Teil der Substanz, aus der die Phosphorsäure bei der CO-Einleitung frei geworden ist, im Barytniederschlag des A-Blutes zu finden ist.

Nachdem wir nun auf diese Weise Klarheit darüber geschaffen haben, daß einmal der Barytniederschlag aus dem sofort — A — oder unmittelbar nach der Defibrinierung gefällten Blute — B — den weitaus größten Teil der organischen Phosphorsäureverbindungen enthält, die durch Kohlensäureeinleitung der Spaltung unterliegen, daß andererseits in dem Barytniederschlag aus dem durchlüfteten Blute die neu gebildete organische Phosphorsäure zum weitaus größten Teil vorhanden ist, können wir an die Betrachtung der Reduktionswerte der Barytniederschläge herangehen (s. Tabelle XIV).

Die Zahlen bedeuten Milligramme, berechnet als Glucose, bezogen auf 100 g Blut.

Tabelle XIV.

Reduktion des Barytniederschlags, berechnet als Glucose.

Nr.	1	2	3	4
	A sofort mg-Proz.	B nach Defibrinieren mg-Proz.	C nach Einleiten von Luft mg-Proz.	D nach Einleiten von CO_2 mg-Proz.
26	1,15 1,09	— —	2,17 2,22	1,17 1,28
27	0,81 0,90	— —	2,72 2,74	1,43
28	0,93 0,90	— —	2,24 2,32	1,09
29	1,21 1,23	1,37 1,12	3,34 3,38	1,74 1,74
30	1,05 1,11	1,15	2,47	1,56 1,65
31	0,96 0,92	0,90 0,81	2,04 2,11	1,44 1,19
32	0,79 0,75	1,12(?)	2,13 2,07	0,85 0,93

Betrachten wir zunächst die Barytreduktion des Ausgangsblutes (Spalten 1 und 2), so sehen wir, daß dieselbe sehr gering ist. Nehmen wir günstigstenfalls an, daß 2 Mol. Phosphorsäure (Mol.-Gew. 196) mit einem Traubenzuckermolekül (Mol.-Gew. 180) zusammentreten, so bekommen wir die maximale Menge der an Zucker gebundenen Phosphorsäure durch Erhöhen der in Tabelle XIV verzeichneten Zahlen um etwa 10 Proz. Das würde also heißen, daß von 60 bis 80 mg-Proz., um welchen Betrag die Menge der organischen löslichen Phosphorsäure im Blute schwankt, etwa 1 bis höchstens 1,5 mg an Glucose gebunden wären.

Die durch Kohlensäureeinleitung verursachte Spaltung organischer Phosphorsäure könnte daher nur zu einem verschwindend kleinen Teile auf Kosten von Hexosephosphorsäure erfolgen.

In der Tat sehen wir denn auch, um das gleich vorweg zu nehmen, die Reduktion nach Einleiten von Kohlensäure nicht ab-, sondern deutlich zunehmen (vgl. Spalte 1 mit 4).

Nach Einleiten von Luft (Spalte 3) ist die Zunahme der Reduktion des Barytniederschlags eine weit größere. Sie beträgt das Zwei- bis Dreifache des Ausgangswertes und stellt damit einen nicht unbeträchtlichen Teil der synthetisierten Phosphorsäure dar.

Als Beispiel diene Versuch 6.

Synthetisierte Phosphorsäure . . 5,59 mg-Proz.
(Differenz der Spalten 1 und 3, Tabelle XIII.)
Zunahme der Reduktion . . . . 2,14 mg-Proz. Glucose
(Differenz der Spalten 3 und 1, Tabelle XIV.)

Für die 2,14 mg Glucose würden zur Bildung einer Hexosediphosphorsäure etwa 2,4 mg Phosphorsäure benötigt, bei der Annahme einer Hexosemonophosphorsäure etwa 1,2 mg, d. h., zwischen 20 und 40 Proz. der in organische Bindung übergehenden Phosphorsäure würden an Zucker gebunden.

Beim Einleiten von Kohlensäure wird diese Zuckerphosphorsäuresynthese nur quantitativ gehemmt. *Wir haben es also mindestens mit zwei verschiedenen Phosphorsäureverbindungen zu tun. Einmal mit einer reduzierenden, die einen namhaften Betrag der bei der Synthese gebildeten organischen Phosphorsäure ausmacht. Diese unterliegt beim Kohlensäureeinleiten nicht der Spaltung; im Gegenteil geht die Synthese derselben trotz Einleitens der Kohlensäure, wenn auch bedeutend verlangsamt, weiter!*

Ob diese Phosphorsäurefraktion am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt ist und inwieweit ihr bei der diabetischen Stoffwechselstörung eine Bedeutung zukommt, darüber soll später berichtet werden.

Die andere Phosphorsäurefraktion, die die größere Menge der unter synthesegünstigen Bedingungen entstehenden Phosphorsäure ausmacht, die allein die bei der Spaltung frei werdende Phosphorsäure abgibt, bleibt weiterhin völlig unbekannt. Sie ist offenbar in großer Menge in den Körperchen gespeichert und scheinbar allein für das charakteristische Bild des Wechsels der Phosphorsäure verantwortlich zu machen. Es muß ihr eine große Bedeutung bei der Atmung zukommen[1]).

Zusammenfassung.

1. Die freie Phosphorsäure des (venösen) Gesamtblutes schwankte in 43 Versuchen zwischen 7,8 und 18,2 mg-Proz.

2. Beim Stehen des Blutes bei Körpertemperatur oder darunter tritt für eine beschränkte Zeit anorganische Phosphorsäure in organische Bindung über.

---

[1]) Schon in Untersuchungen, die von *Embden* noch während meiner Assistententätigkeit im Frankfurter Institut für vegetative Physiologie in Gemeinschaft mit *Martin Erich Mayer* und *mir*, angestellt wurden, konnte gezeigt werden, daß der in der oben geschilderten Weise gewonnene Barytniederschlag nach seiner Zerlegung mit Säuren mindestens zwei verschiedene organische Phosphorsäureverbindungen in Lösung treten läßt, eine, welche ein schön kristallisiertes, schwerlösliches Brucinsalz von charakteristischen Eigenschaften liefert, und eine, welche unter geeigneten Bedingungen ein Osazon mit Phenylhydrazin bildet, das dem aus Muskellactacidogen gewonnenen zum mindesten sehr ähnlich ist.

Beim Erwärmen des Blutes auf 44 bis 45° geht diese Fähigkeit zur Synthese verloren.

3. Beim Durchleiten von Luft oder Wasserstoff durch Blut tritt anorganische Phosphorsäure, und zwar in vermehrter Menge als beim bloßen Stehen des Blutes, in organische Bindung über.

Beim Durchleiten von Kohlensäure setzt umgekehrt eine fortlaufende Spaltung organischer Phosphorsäure ein.

Beide Vorgänge sind in gewissem Grade reversibel.

4. Zusatz von Natriumbicarbonat steigert die Synthese.

5. Zusatz von Phosphat führt zu vermehrter Synthese, Anreicherung mit Chlorid zu vermehrter Spaltung.

6. Kationen sind am nicht hämolytischen Blute unwirksam.

7. Macht man Blut durch Eintragen in Wasser hämolytisch, so findet eine weitgehende Spaltung organischer Phosphorsäure statt.

Durch Kalium oder Natrium läßt sich diese Spaltung beschleunigen, durch Calcium wird sie gehemmt.

8. Unter synthesegünstigen Bedingungen (Stehen des Blutes, Einleiten von Luft) tritt sowohl freie als gebundene Phosphorsäure aus dem Serum in die Körperchen über.

Beim Durchleiten von Kohlensäure tritt sowohl freie als gebundene Phosphorsäure aus den Körperchen aus.

9. Es handelt sich bei der Synthese um einen Übergang freier Phosphorsäure in eine säurelösliche organische Form, umgekehrt geht bei der Spaltung nur säurelösliche organische Phosphorsäure in freie Phosphorsäure über.

10. Ein Teil der synthetisierten Phosphorsäure hat reduzierende Eigenschaften und ist wahrscheinlich eine Hexosephosphorsäureverbindung. Diese unterliegt jedoch nicht der Spaltung.

Über die Ernährung von Pflanzen mit Aldehyden. IV[1]).

Von

Th. Sabalitschka.

Verhalten und Nachweis von Formaldehyd in Pflanzen und Pflanzensubstanz.

Von

Th. Sabalitschka und H. Riesenberg.

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 7. Januar 1924.)

Unlängst konnten wir zeigen[2]), daß die Bestimmung des Zuckers und der Stärke in den mit Formaldehyd behandelten Pflanzen nach *Sabalitschka* durch vielleicht in der Pflanze noch vorhandenen unveränderten Formaldehyd nicht gestört wird. Zum Nachweis und zur quantitativen Ermittlung der an sich geringen Formaldehydmengen trennten wir diese durch Destillation von den anderen organischen Stoffen (Blattextrakt oder Blattpulver) und bestimmten in den Destillaten den Formaldehyd kolorimetrisch mit alkalischer Phloroglucinlösung. Wir fanden in den Extrakten, welche wir gemäß der bei den Formaldehydernährungsversuchen angewandten Methode darstellten, Formaldehyd auch nicht in Spuren, in sehr geringen Mengen im Blattpulver. Das ebenso wie bei den Formaldehydernährungsversuchen behandelte Blattpulver enthielt noch 0,1 mg Formaldehyd. Es war nun von Interesse, auf gleichem Wege den ursprünglichen Formaldehydgehalt der Blätter der mit Formaldehyd behandelten Pflanze zu ermitteln und das Verhalten des Formaldehyds bei der Vorbereitung der Blätter zur Zucker- und Stärkebestimmung zu studieren.

Wir boten der Kapuzinerkresse im Dunkeln ebenso wie bei den früheren Versuchen[1]) Formaldehyd in der Atmosphäre, und zwar unter Verwendung einer 2proz. Paraformlösung. Nachdem sich die Pflanze mehrere Tage in der Formaldehydatmosphäre befunden hatte, zerrieben wir 1 g der frischen Blattspreiten mit 5 ccm Wasser zu einem Brei und destillierten

---

[1]) Ber. d. Deutsch. pharmaz. Ges. **32**, 278, 1922; diese Zeitschr. **144**, 545, 551, 1924.
[2]) Diese Zeitschr. **144**, 551, 1924.

wie früher 4 ccm ab. 2 ccm des Destillates benutzten wir zur Phloroglucinprobe. Zur kolorimetrischen Schätzung des Formaldehydgehaltes des Blattbreies dienten Vergleichsfärbungen, die wir in gleicher Weise erhielten mit Destillaten von Blattbrei, jeweils bereitet aus 1 g frischen, direkt von im Freien sich befindenden Kapuzinerkressen genommenen Blattspreiten und 5 ccm Wasser unter Zusatz von Paraform; es wurden zugesetzt 1, 0,5 und 0,1 mg Paraform. Die Blätter der mit Formaldehyd in der Atmosphäre behandelten Pflanzen ergaben eine Färbung, die zwischen den Vergleichsversuchen mit 0,5 und 0,1 mg Paraform lag; die Blätter der Formaldehydpflanze enthielten somit in 1 g frischen Blättern weniger als 0,5 mg Formaldehyd.

1 g frische Blätter der Formaldehydpflanze wurden getrocknet, gepulvert, weiter bis zum konstanten Gewicht getrocknet, mit 5 ccm Wasser angerieben und von dem Gemisch 4 ccm abdestilliert. 2 ccm des Destillats dienten zur Phloroglucinprobe. Durchschnittlich gaben 1 g frische Blattspreiten ungefähr 0,1 g absolut trockenes Pulver. Zum Vergleich dienten Destillate von 0,1 g Pulver von Blättern, die von im Freien gewachsenen Kapuzinerkressen stammten, und 5 ccm Wasser, dem 0,5, 0,3 und 0,1 mg Paraform zugesetzt waren. Die Färbung, welche die mit Formaldehyd in der Atmosphäre behandelte Pflanze ergab, entsprach einem Formaldehydgehalt von ungefähr 0,2 mg.

Ferner extrahierten wir 0,15 g des bis zum konstanten Gewicht getrockneten Blattspreitenpulvers der mit Formaldehyd behandelten Kapuzinerkresse mit 25 ccm Wasser in derselben Weise wie früher, saugten dann ab, dampften das Filtrat auf dem Wasserbade ein und trockneten den Rückstand bis zum konstanten Gewicht. Das Blattpulver wurde mit Alkohol nachgewaschen und nach dem vollkommenen Verdunsten des Alkohols mit 5 ccm 2proz. Phosphorsäure 3 Stunden im siedenden Wasserbade unter dem Rückflußkühler erhitzt; dadurch sollten etwa vorhandene Formaldehyd-Eiweißverbindungen zerlegt werden. Hierauf destillierte man 4 ccm ab und führte mit 2 ccm des Destillates die Phloroglucinprobe aus. Die Färbung war nur schwach. Die gleiche Färbung erhielten wir, wenn wir 0,15 g absolut trockenes Pulver von Kapuzinerkressenblättern in der gleichen Weise mit Wasser extrahierten, mit Alkohol nachwuschen, hierauf mit 5 ccm 2proz. Phosphorsäure und 0,1 mg Paraform versetzten und weiter wie oben verfuhren. Das bis zum konstanten Gewicht getrocknete, mit Wasser extrahierte und mit Alkohol ausgewaschene Blattpulver der mit Formaldehyd behandelten Pflanzen enthielt somit noch ungefähr 0,1 mg Formaldehyd.

Den Trockenrückstand des wässerigen Extraktes lösten wir in 5 ccm Wasser und destillierten 4 ccm ab. In dem Destillat konnten wir Formaldehyd hier nicht nachweisen.

Es enthielten die frischen Blätter der mit Formaldehyd in der Atmosphäre behandelten Kapuzinerkresse in 1 g weniger als 0,5 mg, die getrockneten Blätter in der entsprechenden Menge Blattsubstanz noch ungefähr 0,2 mg, die getrockneten und extrahierten Blätter noch ungefähr 0,1 mg und der Trockenrückstand des wässerigen Blattextraktes keinen Formaldehyd. Die beiden letzten Befunde decken sich mit unseren früheren Beobachtungen. Bemerkenswert ist der niedrige Gehalt der frischen Blätter an Formaldehyd. 1 g frische

Blätter enthalten ungefähr 0,9 g Wasser; daraus ergibt sich der Formaldehydgehalt für den Zellsaft geringer als 0,055 Proz. Die im gleichen Raume aufgestellte Formaldehydlösung enthielt 2 Proz., sie war also mindestens 40 mal so stark. Dies läßt vermuten, daß die Konzentration des Formaldehyds in der Pflanze sich nicht der Konzentration der im gleichen Raume vorhandenen Lösung anpassen kann, daß also der Formaldehyd von der Pflanze zu höheren Kohlehydraten umgeformt oder sonstwie verändert wird, so daß er sich dem Nachweis entzieht.

Hier und auch bei früheren Versuchen beobachteten wir, daß Formaldehyd, den man Blattsubstanz, z. B. Blattbrei oder Blattpulver, zusetzt, von dieser bei der Destillation teilweise zurückgehalten wird; die Färbungen mit der alkalischen Phloroglucinlösung fallen dann schwächer aus, als wenn man die Reaktion mit den Destillaten von reinen wässerigen Lösungen derselben Formaldehydkonzentration anstellt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Mitteilung von *H. Fincke*[1]).

Fincke versetzte frischen Rhabarberblattbrei mit verschiedenen geringen Formaldehydmengen und preßte nach Zufügung von Salzsäure den Saft sofort ab; bei einem anderen Versuch ließ er den Formaldehyd vor dem Abpressen 2 Stunden auf den Blattbrei einwirken. Schon bei der kurzen Dauer der Einwirkung konnte Formaldehyd, wenn er nur in sehr geringen Mengen zugesetzt war, im Preßsaft nicht mehr nachgewiesen werden; bei der zweistündigen Einwirkung entzog sich dann die zweifache Formaldehydmenge dem Nachweis. Auch ein Blattbrei, der ½ Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt war, besaß noch die Fähigkeit, Formaldehyd zum Verschwinden zu bringen; am stärksten war das Verschwinden des Formaldehyds, wenn man ihn mit dem Blattbrei erwärmte.

Wir versetzten einen Brei von 1 g frischen Rhabarberblättern und 4 ccm Wasser mit 1 ccm 0,01proz. Paraformlösung und bewahrten das Gemisch 24 Stunden bei Zimmertemperatur auf. Sodann destillierten wir 4 ccm über; die Phloroglucinprobe, ausgeführt mit 2 ccm des Destillates, war vollkommen negativ. Setzten wir zu dem Blattbrei die zehnfache Menge Paraform und verfuhren ebenso, dann erhielten wir eine Rosafärbung, die aber schwächer war, als wenn wir die Phloroglucinprobe mit dem Destillat einer reinen wässerigen Lösung derselben Formaldehydkonzentration ausführten. Führten wir die gleichen Versuche mit Blättern der Kapuzinerkresse durch, so erhielten wir bereits bei 0,1 mg Paraform eine sehr schwache Färbung, bei 1 mg Paraform eine stärkere Färbung als bei demselben Versuch mit den Rhabarberblättern. Ließen wir die Gemische des Blattbreies der beiden Blattarten mit den verschiedenen Formaldehydmengen anstatt 24 Stunden nur 2 Stunden stehen, so waren die Färbungen mit alkalischer Phloroglucinlösung die gleichen. Es dürfte daher die Bindung oder Veränderung des Formaldehyds durch die Pflanzensubstanz rasch vor sich gehen.

Wenn wir einen Brei von 1 g frischen Kressenblättern und 4 ccm Wasser mit 1 ccm 0,01proz. Formaldehydlösung 1 Stunde lang unter dem

[1]) Diese Zeitschr. **52**, 214, 1913.

Rückflußkühler im siedenden Wasserbade erhitzten, so erhielten wir nur noch eine ganz schwache Färbung mit alkalischer Phloroglucinlösung. Die zugesetzte Paraformmenge verhielt sich zum Blattbrei wie 1: 60 000, zur Blattsubstanz wie 1: 10 000. *Fincke* konnte im Gegensatz dazu bei Rhabarberblättern Formaldehyd nicht mehr nachweisen, wenn er unter ähnlichen Bedingungen Formaldehyd und Blattsubstanz im Verhältnis 1: 6666 aufeinander einwirken ließ. Dies veranlaßte uns, die Versuche unter Anwendung von Rhabarberblättern zu wiederholen. Diesmal blieb in der Tat auch eine schwache Färbung aus. Erst wenn wir Paraform und Blattsubstanz im Verhältnis 1 : 5000, also 0,2 mg Paraform und 1 g Blattsubstanz anwandten, trat eine gerade noch wahrnehmbare Färbung auf; bei einem Verhältnis von Paraform und Blattsubstanz 1 : 1000 war die Färbung bereits deutlich; sie entsprach aber an Intensität nicht der Färbung, welche wir bei demselben Versuch mit Kressenblättern erhielten.

Die Blattsubstanz der Kapuzinerkresse bindet oder verändert geringe Formaldehydmengen derart, daß ihr Nachweis unmöglich wird, allerdings in etwas kleinerem Maße als es *Fincke* bei Rhabarberblättern feststellte. Die damaligen Beobachtungen *Finckes* haben sich vollkommen bestätigt.

Die Blattsubstanz entspricht hier dem Verhalten tierischer Substanz gegenüber Formaldehyd. So berichten *Simon*[1]) und dann *C. Salkowski*[2]), daß Formaldehyd schnell aus Blut verschwindet. Während *C. Salkowski* eine Bindung des Formaldehyds durch die Organe annimmt, schließen andere auf eine rasche Oxydation des Formaldehyds zu Ameisensäure. Immerhin sind es nur geringe Formaldehydmengen, welche die Pflanzensubstanz dem Nachweis entzieht. Die darüber hinaus vorhandenen Formaldehydmengen sind im Gegensatz dazu teilweise recht beständig; war doch der Formaldehydnachweis noch nach längerer Zeit und verschiedentlicher Behandlung des Pflanzenmaterials möglich. Wir fanden in dem bis zum konstanten Gewicht getrockneten und mit Wasser und Alkohol extrahierten Blattpulver der mit Formaldehyd behandelten Pflanze stets noch geringe Mengen Formaldehyd. Dies entspricht den Beobachtungen von *H. Lührig*[3]) und von *A. Brüning*[4]) an Leichenteilen, Nahrungsmitteln und dergleichen, wobei sich die Beständigkeit des Formaldehyds in solchen organischen Stoffen als wesentlich größer erwies, als man bisher wegen der Reaktionsfähigkeit des Formaldehyds annahm.

Die empfindliche Probe auf Formaldehyd mit alkalischer Phloroglucinlösung benutzten wir noch, um nach dem Vorkommen von Formaldehyd in den Pflanzen zu fahnden.

Man hat sich wiederholt bemüht, den Nachweis von Formaldehyd in den Pflanzen zu erbringen. *Th. Curtius* und *H. Franzen*[5]) oxydierten den Formaldehyd zu Ameisensäure und wiesen dann diese nach; sie haben aber später selbst die Brauchbarkeit des so erhaltenen Formaldehydnachweises

---

1) Diese Zeitschr. **65**, 87, 1914.
2) Ebendaselbst **115**, 159, 1921.
3) Pharmazeut. Zentralhalle **63**, 597, 1922.
4) Ber. d. Deutsch. pharmazeut. Ges. **33**, 99, 1923.
5) B. **45**, 1715, 1912.

verneint[1]). *Kleinstück*[2]) hat im Cambialsaft der Coniferen mit verschiedenen, nicht genügend spezifischen Reagenzien, *Schryver*[3]) im isolierten Chlorophyll mit Phenylhydrazinchlorid, Kaliumferricyanid und konzentrierter Schwefelsäure Formaldehyd nachgewiesen. *Angelico* und *Catalano*[4]) wollen in zahlreichen Pflanzen Formaldehyd nachgewiesen haben mit dem „aktiven Prinzip" von Atractylis gummifera und Schwefelsäure. Dieses Reagens soll brauchbar sein bis zur Formaldehydkonzentration 1 : 30000. Neuerdings berichten *J. H. Priestley* und *D. Armstead*[5]), sie hätten im Blutungssaft von Fuchsia eine Substanz beobachtet, deren Geruch an Kondensationsprodukte des Formaldehyds erinnerte. Im Gegensatz dazu konnte *H. Fincke*[6]) mit fuchsinschwefliger Säure, die noch Formaldehyd in Verdünnungen 1 : 500000 erkennen läßt, Formaldehyd in frischen Blättern nicht nachweisen. Die von uns benutzte alkalische Phloroglucinlösung ist brauchbar bei Formaldehydlösungen, deren Konzentration noch unter 1 : 1000000 ist.

1 g frische Blätter einer im Freien wachsenden, belichteten Kapuzinerkresse wurden mit 5 ccm Wasser zu einem Brei angerieben und von diesem 4 ccm abdestilliert. Die mit je 2 ccm des Destillates ausgeführte Phloroglucinprobe war vollkommen negativ. Somit war auch mit diesem empfindlichen Reagens der Nachweis von Formaldehyd in frischen Blättern nicht möglich.

Aus der Unmöglichkeit, Formaldehyd bisher in den Pflanzen nachzuweisen, ergibt sich aber keineswegs die Unrichtigkeit der *Baeyer*schen Assimilationshypothese. Der Formaldehyd wird in der Pflanze bei der Assimilation nur vorübergehend erscheinen und ob seiner großen Reaktionsfähigkeit sofort wieder verschwinden, so daß der jeweilige Gehalt der Pflanzen an Formaldehyd nur gering ist. *P. R. Kögel*[7]) kam durch theoretische Überlegungen zu dem Schluß, daß der Formaldehyd bereits in seiner Entstehungsform oder noch unmittelbar vorher zur Zuckersynthese verwendet werden kann. Weiter konnten *H. Fincke*[8]) und wir zeigen, daß geringe Formaldehydmengen, die man Pflanzensubstanz zusetzt, von dieser sofort so gebunden werden, daß sie sich dem Nachweis entziehen. Daraus läßt sich schließen, daß geringe Formaldehydmengen in Pflanzensubstanz überhaupt nach den bisherigen Methoden nicht nachweisbar sind, auch wenn sie dort an sich vorhanden sind. So spricht die bisherige Unmöglichkeit des Formaldehydnachweises in den Pflanzen keineswegs gegen die *Baeyer*sche Assimilationshypothese, wie auch umgekehrt ein einwand-

---

[1]) Ann. 404, 105, 1914.
[2]) B. 45, 2902, 1912.
[3]) Proc. Royal Soc. London 82, 226; ref. C. C. 1910, 1, 1366.
[4]) Gazz. chim. ital. 43, I, 38, 1913; C. C. 1913, 1, 1352.
[5]) New Phytologist 21, 62, 1922; Bot. Centralbl. 2, 166, 1923.
[6]) Diese Zeitschr. 52, 214, 1913.
[7]) Ebendaselbst 94, 313, 1919.
[8]) l. c.

freier positiver Formaldehydnachweis nach *R. Willstätter* und *A. Stoll*[1]) noch kein Beweis für die Richtigkeit dieser Assimilationshypothese ist. Der Formaldehyd könnte in der Pflanze auch auf andere Weise entstanden sein und nicht durch Desoxydation der Kohlensäure. Hat doch *C. Neuberg*[2]) gezeigt, daß sowohl Methylalkohol wie Glykokoll bei Bestrahlung Formaldehyd geben. Beide Stoffe können aber in den Pflanzen vorkommen, der Methylalkohol als Komponente des Pektins, das Glykokoll als Eiweißspaltungsprodukt. *Spoehr*[3]) bewies, daß Formaldehyd bei der Photolyse von Glykolsäure, Äpfelsäure und Essigsäure sich bildet, während *M. Volmar*[4]) die Entstehung von Formaldehyd bei der Photolyse von Weinsäure feststellte, was wiederum dem von *C. Neuberg*[5]) bei anderen Oxysäuren schon früher beobachteten Abbau analog ist.

---

[1]) B. **50**, 1777, 1918; *R. Willstätter* und *A. Stoll*, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, S. 377 Berlin 1918.

[2]) Diese Zeitschr. **18**, 305, 1908; **29**, 279, 1910.

[3]) Ebendaselbst **57**, 95, 1913.

[4]) C. r. **176**, 742; ref. C. C. 1923. **8**, 1212.

[5]) l. c.

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

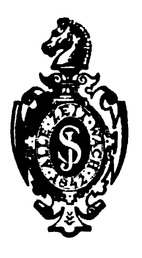
herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfundvierzigster Band

Fünftes und sechstes Heft

Ausgegeben am 20. März 1924



Berlin

Verlag von Julius Springer

1924

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint in zwanglosen Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band im Umfange von 36—40 Bogen.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen, um unliebsame Überraschungen zu vermeiden.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

145. Band. **Inhaltsverzeichnis.** Heft 5/6.

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Hartog Jakob Hamburger †.

Einer der bedeutendsten zeitgenössischen Physiologen, dessen Lebenswerk im wesentlichen die biochemische Seite seines Faches umfaßte, ist mit Prof. *H. J. Hamburger* dahingegangen; am 4. Januar dieses Jahres verschied er in Groningen, der Stätte seiner langjährigen Tätigkeit. Über die Laufbahn *Hamburgers* unterrichtet eine Biographie aus der Feder seines Freundes *Ernst Cohen*, Utrecht, im Festbande der „Biochemischen Zeitschrift", der im Jahre 1908 dem großen Gelehrten gewidmet worden ist.

Die zahlreichen von *Hamburger* und von den Forschern, die sich um ihn scharten, in dieser Zeitschrift veröffentlichten Arbeiten zeigen, daß es besonders die physikalisch-chemischen Zweige der Biochemie gewesen sind, die *Hamburger* gepflegt und von den verschiedensten Richtungen her gefördert hat. Grundlegend für die Wissenschaft wie für sein Lebenswerk wurde seine Jugendarbeit über die Veränderung der roten Blutkörperchen mit dem Wechsel der osmotischen Bedingungen des sie umgebenden Mediums. Seine Experimente über die Permeabilität der Zellen, seine Feststellungen über die Rolle der Calciumionen bei der Phagocytose, seine und seiner Schüler grundlegenden Beiträge zur Lehre von der Hämolyse, die Arbeiten der letzten Jahre über die biologische Differenzierung stereoisomerer Zuckerarten, ferner die Untersuchungen über die verschiedenen Verbindungen (Vagusstoffe, Sympathicusstoffe), die bei den Nervenreizungen frei werden und auf humoralem Wege dann Effekte an verschiedenen Organen äußern und ihr Zusammenwirken regeln, die von ihm ge-

schaffenen neuen mikrochemischen Methoden, bei denen er sich mit größtem Erfolge der Leistungen der Zentrifuge bediente, bilden für alle Zeit grundlegende Ergebnisse der Biochemie.

Durch sein in weiteste Kreise gedrungenes Werk: „Osmotischer Druck und Ionenlehre in den medizinischen Wissenschaften“ hat er sich um die Verbreitung physikalisch-chemischer Kenntnisse unvergängliche Verdienste erworben, die Biologen und Chemiker mit hohem Danke anerkannt haben. *H. J. Hamburger* hat viel dazu beigetragen, daß der vom klassischen Lande der physikalischen Chemie seit den Tagen *van 't Hoffs* ausgehende befruchtende Einfluß der physikalischen Chemie heute die gesamten biologischen Disziplinen umspannt.

C. N.

Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien. I.

Von

H. Braun, A. Stamatelakis und Seigo Kondo.

(Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des hygienischen Universitätsinstituts in Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 6. Januar 1924.)

Einleitung.

Die genaue Kenntnis des Stoffwechsels der pathogenen Mikroorganismen ist in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Die Grundlage bildet der Verwendungsstoffwechsel der Keime, d. h. die Frage: Aus welchen Stoffen und unter welchen besonderen Bedingungen können die Bakterienarten dauernd ihre Körpersubstanz aufbauen? Geht man in dieser Weise vor, so gelangt man, wie in früheren Untersuchungen von *H. Braun* und *C. E. Cahn-Bronner*[1]) an Bakterien der Typhus-Koligruppe gezeigt worden ist, zu Nährböden, die nur wenige, einfach gebaute chemische Stoffe enthalten, so daß ohne weiteres ersichtlich ist, wo die Phosphor-, wo die Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, und wo die energiespendende Substanz zu suchen ist. So läßt sich zunächst für die einzelnen Arten das Unentbehrliche an Nährstoffen feststellen, indem man ihnen nur je eine Phosphor-, Stickstoff- und Kohlenstoffverbindung bietet und dafür die einfachsten Stoffe auswählt, mit welchen eine dauernde Fortzüchtung möglich ist. Durch Variationen der chemischen und energetischen Bedingungen lassen sich dann die Ansprüche der verschiedenen Arten und der verschiedenen Stämme derselben Art prüfen.

Wir möchten hier ganz kurz die Fragen aufwerfen, deren Lösung mit Hilfe des Studiums des Verwendungsstoffwechsels versucht werden sollte.

Die üblichen Züchtungsmethoden, die sich des Fleischwassers als Nährbodengrundlage bedienen, sind zwar für die Diagnostik und Abgrenzung der verschiedenen Bakterienarten brauchbar. Aber es wird wohl jeder zugeben müssen, daß sie in dieser Hinsicht bei manchen

[1]) Diese Zeitschr. **131**, 1922.

Bakterienarten versagen. Der Stoffwechsel ist in ihnen unübersichtlich und viel zu kompliziert. Dagegen läßt sich in den einfachen künstlichen Nährböden die Assimilation und Dissimilation der verschiedenen dargebotenen Stoffe genauestens prüfen. Auf diese Weise werden Stoffwechselunterschiede feststellbar, die sich in den gewöhnlichen Nährböden unserer Beobachtung entziehen. Um Wiederholungen zu vermeiden, möchten wir auf die Anführung von Beweisen für diese Behauptung hier verzichten und verweisen auf unsere früheren Arbeiten an Typhus-, Paratyphus A- und B-, Shiga-Kruse- und Kolibazillen usw., die in dieser Zeitschrift **131**, 1922, erschienen sind. Es möge nur erwähnt werden, daß es mit Hilfe der Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels nachzuweisen gelang, daß es Unterschiede nicht nur zwischen den verschiedenen Bakterienarten, sondern auch zwischen den verschiedenen Stämmen derselben Art, ja sogar zwischen den verschiedenen Individuen derselben Kultur gibt. Diese Unterschiede beziehen sich auf die Assimilation, Dissimilation und auf den Energiebedarf. So kann man z. B. gelegentlich aus einer Typhusbazillenkultur Keime züchten, die Ammoniak nicht zu assimilieren vermögen, und gleichzeitig solche, die Ammoniak als Stickstoffquelle benutzen können; unter den Ammoniak verwertenden Keimen kann man wiederum solche herauszüchten, die Citronensäure anzugreifen vermögen, und solche, die dazu nicht befähigt sind. Die verschiedenen Typhusbazillenstämme können also sowohl in ihren assimilatorischen wie dissimilatorischen Fähigkeiten Unterschiede aufweisen.

Da die Untersuchung des Stoffwechsels mit Hilfe der üblichen Fleischwassernährböden die Entscheidung der Frage über die verwandtschaftlichen Beziehungen und die *Abgrenzung der verschiedenen säurefesten Bakterien* bis jetzt nicht herbeiführen konnte, schien uns der Weg über die Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels gangbar.

Mit einigen Worten wollen wir noch darauf eingehen, inwiefern die Prüfung des Verwendungsstoffwechsels der Bakterien auch für die Lösung anderer Fragen herangezogen werden könnte.

Wenn wir von einem Mikroorganismus wissen, welche Stoffe unbedingt zu seinem Leben notwendig sind, so liegt der Gedanke nahe, zu untersuchen, ob die besondere *Disposition* mancher Körpergewebe für bestimmte Infektionen mit dem reichlichen Gehalt an den notwendigen Nahrungsbestandteilen zu erklären ist. Selbstverständlich wird die Unempfänglichkeit nicht in allen Fällen auf die Abwesenheit der notwendigen Nahrungsbestandteile zurückzuführen sein. Denn das Wachstum wird auch ausbleiben, wenn das Organ die nötigen Nahrungsbestandteile enthält, aber gleichzeitig Abwehrmaßnahmen gegen die Infektion besitzt. Die Vorbedingung aber, daß ein Mikroorganismus in einem Gewebe wachsen kann, ist, daß die notwendigen Nahrungs-

bestandteile vorhanden sind. Wir werden bei der Besprechung des Verwendungsstoffwechsels des Tuberkelbazillus auf diese Frage zurückkommen.

Besonders nötig ist es, mit Hilfe der aus chemisch bekannten Stoffen hergestellten Nährböden die *Stoffwechselprodukte* der Mikroorganismen zu untersuchen. Man wird sie in reinerer Form gewinnen können und wird auch den Versuch unternehmen, ihre chemische Natur zu ergründen, was in den üblichen Nährböden wegen ihrer Kompliziertheit sehr schwierig oder unmöglich ist. Wir denken dabei nicht nur an die Gifte, sondern auch an das Studium der *Fermente*. Die Fermentforschung hat in dieser Richtung *M. Jacoby*[1]) in Angriff genommen. Die wichtigen Untersuchungen *M. Jacobys* müßten unbedingt mit geeigneten Bakterien aufgenommen und vertieft werden. Der Bacillus pyocyaneus zeichnet sich z. B. durch eine außerordentliche Mannigfaltigkeit seiner Fermentleistungen aus. Er vermag sowohl Kohlenhydrate wie Eiweißkörper und Gelatine anzugreifen, und er läßt sich in den künstlichen Nährböden *ausgezeichnet* züchten. Gerade an diesem Objekt die Bedingungen der Fermentbildung und dessen Natur zu untersuchen, scheint uns sehr erfolgversprechend zu sein[2]).

Die Analyse der Ernährungsprozesse der Bakterien, vor allem die Frage, auf welchem *Wege* die Assimilation der verschiedenen Nährstoffe vor sich geht, ist in den künstlichen Nährböden exakt durchführbar und verspricht unserer Meinung nach zur Lösung mancher Fragen der Ernährungsphysiologie beizutragen.

Bevor wir auf die Schilderung des Verwendungsstoffwechsels der saprophytischen säurefesten Bakterien eingehen, möge die verwendete Methodik beschrieben werden.

Die Versuchstechnik.

Wir wollen uns hier nur auf die allgemeinen Grundzüge der Technik beschränken, und dürfen wohl, um Wiederholungen zu vermeiden, auf die ausführliche Beschreibung unserer Methodik in früheren Arbeiten[3]) verweisen. Diese mußte in einigen Details den neuen Aufgaben angepaßt werden.

Um nach Möglichkeit alle unbekannten Beimengungen auszuschalten, muß selbstverständlich möglichst reines Wasser und die reinsten erhältlichen Substanzen verwendet werden. Wir benutzten zu unseren Versuchen doppelt destilliertes Wasser, das wir in Glasgefäßen aus Jenaer Glas auf-

---

[1]) *Jacoby, M.*, diese Zeitschr. **74**, 1916; **79—81**, **83—84**, 1917; **85—88**, 1918.

[2]) *Braun* und *Cahn-Bronner*, Centralbl. f. Bakt., I. Orig., **86**, H. 3, 1921; diese Zeitschr. **131**, 1922; siehe auch *A. Liot*, An. de l'Inst. Pasteur **37**, 1923.

[3]) Diese Zeitschr. **131**, H. 3/4.

bewahrten. Die Züchtungen wurden nicht in Reagenzgläsern, sondern in kleinen Erlenmeyerkölbchen aus gewöhnlichem Glas von 30 bis 50 ccm Inhalt ausgeführt. Denn zum Wachstum unter den gewählten primitiven Ernährungsbedingungen ist, wie uns die Untersuchungen an den Bakterien der Typhus-Koligruppe gezeigt haben, *reichliche Sauerstoffzufuhr* eine der *wichtigsten Vorbedingungen.* Aus äußeren Gründen war es uns nicht möglich, Gefäße aus Jenaer Glas zu benutzen. Wir mußten deshalb mit Spuren von aus dem Glas gelösten Stoffen in unseren Nährflüssigkeiten rechnen. Um diese Fehlerquelle nach Möglichkeit zu vermeiden, wurden die mit Wasser gefüllten Gefäße, bevor sie benutzt wurden, längere Zeit im Dampftopf erhitzt, nachher vaporisiert und dann erst verwendet. Die Chemikalien wurden von den chemischen Werken E. Merck in Darmstadt, zum Teil von den Höchster Farbwerken, bezogen. Öfters ließen wir diese Chemikalien von sachverständiger Seite auf Reinheit prüfen.

Was die Zusammensetzung der Nährböden betrifft, so waren wir darauf bedacht, diese nach Möglichkeit konstant zu erhalten. Deshalb gingen wir meist von bestimmten Stammlösungen aus und variierten je nach Bedarf nur eine Komponente. Als Beispiel diene die Herstellung der Nährlösungen zur Prüfung des Kohlenstoff-Verwendungsstoffwechsels: Wir stellten uns eine Stammlösung her, die in 100 ccm doppelt destillierten Wassers 1 g NaCl, 1 g Ammoniumsulfat, 0,01 g Magnesiumsulfat, 0,4 g Kaliumphosphat (1 Teil primäres + 3 Teile sekundäres Kaliumphosphat) enthielt. Diese Lösung wurde $^1/_4$ Stunde im Dampftopf sterilisiert und auf Reaktion geprüft. Sie reagierte auf Lackmus schwach alkalisch. Bei der Prüfung mit Indikatoren nach *Michaelis* betrug $p_H = 7{,}1$. Von den zu untersuchenden Kohlenstoffquellen wurden 1 proz. Lösungen hergestellt, eventuell neutralisiert und dann sterilisiert. Nachher wurden gleiche Mengen der Stammlösung mit gleichen Mengen der Lösungen der verschiedenen Kohlenstoffquellen zusammengemischt und 10 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Der prozentuelle Gehalt an den einzelnen Bestandteilen war dadurch auf die Hälfte reduziert. Auf analoge Weise gingen wir auch bei der Herstellung verschiedener anderer Nährböden vor, die später besprochen werden. Die *Reaktion* der Nährböden wurde stets mit der Indikatormethode nach *Michaelis* bestimmt. Im allgemeinen wählten wir p_H 6,9 bis 7,1. Wenn nötig, wurde die Neutralisation und die Alkalisierung mit n/10 Sodalösung vorgenommen. Nur für besondere Zwecke, die im Text bezeichnet sind, wurde die Wasserstoffionenkonzentration variiert. In einer besonderen Mitteilung soll über die Rolle der p_H-Konzentration berichtet werden.

Die *Beimpfung* der Nährlösungen geschah mit einer großen Öse. Die erste Passage wurde von festen Nährböden angelegt, um die Übertragung der Nährstoffe aus der bouillonhaltigen Ausgangskultur nach Möglichkeit zu vermeiden. *Stets* wurden *mehrere* Kölbchen *gleichzeitig* geimpft, da man bei den säurefesten Bakterien öfters Unregelmäßigkeiten erlebt, indem in zwei gleichzeitig beimpften Kölbchen in dem einen das Wachstum ein gutes, in dem anderen ein kümmerliches ist oder sogar ganz ausbleibt. Worauf diese Unregelmäßigkeiten zurückzuführen sind, konnten wir nicht ergründen. Sie sind aber so häufig vorhanden, daß die gleichzeitige Beimpfung mehrerer Kölbchen gleicher Nährlösung stets, auch bei *Passagen*, erforderlich ist. Die Beimpfung muß meist so vorgenommen werden, daß die Kulturmasse an der Oberfläche der Nährflüssigkeit schwimmt. Zur Abimpfung wählten wir nach Möglichkeit jüngere Kulturen, je nach Bakterienart, mehrere

Tage bis einige Wochen alt. Niemals beschränkten wir uns bei der Prüfung des Verwendungsstoffwechsels mit dem Wachstum in einer Passage, sondern *stets wurden mindestens fünf Passagen* in demselben Nährboden durchgeführt. Erst die Erfüllung dieser Forderung gibt uns die Sicherheit, daß *der Körperaufbau der Mikroorganismen allein aus den dargebotenen Nährstoffen und nicht etwa aus den mitübertragenen Nährmaterialien der glycerinbouillonhaltigen oder eierhaltigen Nährböden oder durch Reservestoffe, die in den Bakterienleibern aus der Zeit ihrer Zucht auf optimalen Nährböden herrühren, erfolgt.* Dieser Umstand erfordert unserer Ansicht nach eine besondere Beachtung. Gerade bei den säurefesten Bakterien haben wir es des öfteren erlebt, daß auf bestimmten künstlichen Nährböden in den ersten Passagen Wachstum feststellbar war, während es *nicht* in Passagen fortgeführt werden konnte. Diese wichtige Fehlerquelle ist von vielen Autoren unbeachtet geblieben.

Noch ein anderer Umstand, den wir in unseren früheren Arbeiten bereits hervorgehoben haben, ist beachtenswert. Impft man aus einem nährstoffreichen Nährboden, wie ihn z. B. die Glycerinbouillon darstellt, in einen nährstoffarmen ab, so kann das Wachstum *ausbleiben*, während die Kultur *angeht und in Passagen fortzüchtbar ist*, wenn sie von einem *anderen nährstoffarmen*, aus chemisch bekannten Substanzen zusammengesetzten Nährboden angelegt wurde. Wir haben deshalb bei der Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels der *pathogenen* säurefesten Bakterien die Beimpfungen der Nährflüssigkeiten meist auch aus einer gut gewachsenen Kultur eines nährstoffarmen Mediums vorgenommen. Meist wurde dazu ein Nährboden benutzt, der Ammoniak als *einzige* Stickstoffquelle und *zwei* Kohlenstoffquellen (Natriumacetat und Glycerin) enthielt und in dem *alle* geprüften säurefesten Bakterien wuchsen.

Die *Bebrütung* erfolgte je nach Bedarf bei 22° oder bei 37°, und wurde stets auf längere Zeit ausgedehnt. Wir bebrüteten unsere Kulturen bis zu 2 Monaten. Um das Austrocknen der Nährflüssigkeiten zu vermeiden, wurden in kleine Erlenmeyerkölbchen von 30 ccm Inhalt meist 7 bis 10 ccm Nährflüssigkeit gegeben. Außerdem wurde für starke Feuchtigkeit der Brutschrankluft gesorgt. Die einzelnen Kulturen wurden dauernd auf Reinheit mit Hilfe von Gramfärbung und Ziehl-Neelsenfärbung und durch Züchtung auf geeigneten festen und flüssigen bouillon-, eventuell glycerin- und eierhaltigen Nährböden geprüft.

Alle Stoffwechseluntersuchungen wurden nur in *flüssigen* Nährböden durchgeführt, da agarhaltige feste Nährböden nach unseren Erfahrungen *keine* Garantie chemischer Reinheit bieten.

Einige Worte müssen wir über die Beurteilung des Wachstums sagen: Auf dieses muß besonders genau geachtet werden. Handelt es sich doch bei diesen Untersuchungen *nicht um die Frage, ob die dargebotenen Nährstoffe ein schnelles und üppiges Wachstum gestatten, sondern einzig und allein um die Frage der* **Unentbehrlichkeit** *und der* **unmittelbaren Assimilierbarkeit** *und* **Angreifbarkeit** *der Nährmaterialien.* Unter den gewählten primitiven Bedingungen ist das Wachstum oft nur bei besonders sorgfältiger Beobachtung feststellbar. An der Oberfläche der beimpften Nährböden bilden sich manchmal nur ganz zarte Netze und hauchartige Häutchen, die bei flüchtiger Betrachtung der Beobachtung entgehen, und die doch ein Beweis dafür sind, daß die gelieferten Nährstoffe, wenn auch mühsam, verwertet worden sind. Um dieses geringe Wachstum nicht zu übersehen, ist es notwendig, die Kölbchen *stets* nicht nur im auffallenden, sondern vor allem im

durchfallenden Lichte zu betrachten; während man häufig bei der Betrachtung der Nährbodenoberfläche von oben kein Wachstum sieht, zeigt sich bei dem Betrachten der Nährflüssigkeit von unten durch den Boden des Kölbchens ein deutliches, bläulich-weißes, sehr zartes Häutchen oder Netz, das häufig die ganze Oberfläche der Nährflüssigkeit bedeckt. Auf diese Tatsache möchten wir hier besonders hinweisen!

I. Teil.

Der Verwendungsstoffwechsel des Timotheebazillus.

Über die synthetischen Fähigkeiten saprophytischer säurefesten Bakterien liegen bereits einige gründliche Arbeiten vor, so die von *Söhngen*[1]), *Vierling*[2]), *Long*[3]), *Stephensohn*, *M.* und *M. Dampier Whetham*[4]). Da sich aber die Methoden dieser Autoren in manchen wesentlichen Momenten von der unserigen unterscheiden (Benutzung agarhaltiger Nährböden, Fehlen von Passagen usw.), haben wir es unternommen, mit unserer Methodik die Untersuchungen durchzuführen, um den Stoffwechsel der Saprophyten mit dem der pathogenen säurefesten Bakterien vergleichen zu können. Von den Saprophyten wurde von uns am eingehendsten der Timotheebazillus von *Möller* geprüft. Die Kultur verdanken wir den Herren Geheimrat *Kolle* und Dr. *Schlossberger*. Sie zeigte folgendes Verhalten bei der üblichen bakteriologischen Untersuchung:

Morphologie und Färbbarkeit: Bei der gewöhnlichen Gramfärbung von Agarkulturen sieht man Stäbchen verschiedener Länge, ganz kurze bis mittellange, die Form ist sehr mannigfaltig, die Färbung sehr ungleichmäßig: Im entfärbten Bakterienleib sieht man öfters dunkelblauschwarze Körnchen. Bei der Ziehl-Neelsenfärbung sind entfärbte und rotgefärbte Stäbchen vorhanden. Sowohl bei 22° wie bei 37° wächst der Timotheebazillus auf den üblichen bouillonhaltigen Nährböden. Auf dem gewöhnlichen Nähragar bildet er nach einigen Tagen einen üppigen trockenen, weißlichen, runzeligen Belag. In der Bouillon entsteht ein Häutchen, das entlang der Glaswand emporsteigt. Auf Löfflerserum bildet sich ein hellgelber, dicker, krümeliger Belag. Tryptische Fermente werden auf diesem Nährboden nicht gebildet. In der Gelatinestichkultur wächst er nur an der Oberfläche und verflüssigt die Gelatine nicht. In tryptophanhaltigen Nährböden (Trypsinbouillon nach *Frieber*) bildet er ein zartes Häutchen, Indolbildung ist *nicht* nachweisbar. In Traubenzuckerbouillon wächst er nur bei aeroben, nicht unter anaeroben Verhältnissen. Die Kolonieform auf dem gewöhnlichen Agar hat nach einigen Tagen folgendes Aussehen: Sie stellt ein unregelmäßig begrenztes trockenes Häutchen dar, das in der Mitte bräunlich, am Rand weiß-gelblich ist. Bei schwacher Vergrößerung sieht man einen gewellten Rand, der fein ausgefranst ist. Die Oberfläche ist runzelig. Auf Glycerinagar bildet der Timotheebazillus bei 37° nach einigen Tagen einen

---

[1]) Centralbl. f. Bakt., Orig. II, 37, 1913.
[2]) Ebendaselbst 52, 1920.
[3]) Amer. rev. of tubercul. 5, 1922.
[4]) Proc. of the roy. soc., Ser. B, 93, 1922.

gewellten, trockenen, dicken, weißlich-gelblichen Rasen. Bei 22° wächst er gut, aber nicht so schnell wie bei 37°. Bei längerer Bebrütung bildet er auf ihm zusagenden Nährböden einen gelblichen Farbstoff. Amylase und Lipasen gegen Rinder- und Schweinefett sind nicht nachweisbar. Auf Agarplatten, denen defibriniertes gewaschenes Kaninchenblut zugesetzt wurde, tritt bei *zwei- bis dreitägiger* Bebrütung Hämolyse ein.

Was die Virulenz betrifft, so haben wir dieselbe am Meerschweinchen geprüft. Große Mengen der Kultur (½ Agarkultur) subkutan in der Schenkelbeuge injiziert, verursachten eine Lymphdrüsenschwellung, die manchmal, wenn auch nicht immer, zu Eiterung und Durchbruch führte. Der Prozeß heilte aus. Wurden die Tiere nach mehreren (3 bis 5) Monaten getötet, so konnten in den inneren Organen makroskopisch keinerlei Veränderungen wahrgenommen werden, und auch an der Infektionsstelle war außer Verwachsungen kein pathologischer Befund feststellbar.

Bei der Untersuchung des Stoffwechsels der säurefesten Saprophyten stießen wir auf eine Eigenschaft, die bis jetzt nicht genügende Beachtung gefunden hatte. Diese Mikroorganismen sind nämlich von einer außergewöhnlichen *Genügsamkeit.* Da diese Tatsache sowohl für die Technik der ernährungsphysiologischen Versuche, wie auch für die Charakteristik dieser Mikroorganismen von Wichtigkeit ist, möchten wir einige Versuche, die diese Frage betreffen, der Besprechung des Verwendungsstoffwechsels des Timotheebazillus voranstellen.

Impft man eine Nährlösung, die in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,5 g Ammoniumsulfat, 0,005 g Magnesiumsulfat und 0,2 g Phosphatgemisch (1 Teil primäres und 3 Teile sekundäres Kaliumphosphat) enthält, der also eine Kohlenstoffquelle *fehlt,* mit dem Timotheebazillus und bebrütet bei 37°, so kann man ein mühsames, kümmerliches Wachstum in *Passagen* feststellen. Ein Versuch möge besprochen werden.

Die am 11. Oktober 1922 beimpfte Nährlösung zeigte am 17. Oktober geringes Wachstum. Am 27. Oktober ist bereits ein großer Teil der Nährbodenoberfläche mit einem sehr zarten Häutchen bedeckt, das aus grampositiven und säurefesten Stäbchen besteht. Von dieser Kultur wurde am 23. Oktober die erste, von letzterer am 3. November die zweite, dann am 17. November die dritte, nachher am 28. November die vierte, am 4. Dezember die fünfte Passage abgeimpft. Am 12. Januar wurde der Versuch abgeschlossen. Auch in der fünften Passage entwickelte sich ein sehr zartes Häutchen, das einen großen Teil der Nährbodenoberfläche bedeckte. Wurden Kölbchen, die physiologische Kochsalzlösung oder destilliertes Wasser enthielten, beimpft, so erfolgte *kein* Wachstum.

Die Züchtung in dem oben angeführten kohlenstofffreien Nährboden erstreckte sich also in fünf Passagen 3 Monate lang. Das Wachstum könnte so erklärt werden, daß die Bakterien kohlenstoffhaltige Reservestoffe in ihrem Körper enthielten, die sie erst allmählich aufbrauchten. Diese Annahme scheint uns aber keine große Wahrscheinlichkeit zu haben; plausibler ist die Annahme, daß die kohlenstoffhaltigen Be-

standteile der Brutschrankluft das Wachstum ermöglichten. Wissen wir doch durch die Untersuchungen von *Söhngen*, daß die säurefesten Saprophyten das der Luft in gasförmiger Form beigemischte Benzin, Petroleum usw. als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können.

Welche Kohlenstoffverbindungen der Luft in unseren Versuchen die *C*-Quelle bilden, muß eingehend geprüft werden. Zurzeit können wir nichts Bestimmtes darüber aussagen.

Der Ausfall dieser Versuche veranlaßte uns, zu untersuchen, ob ein Wachstum des Timotheebazillus bei Abwesenheit einer Stickstoffquelle möglich ist. In einer Nährlösung, die 0,5 Proz. NaCl, 0,2 Proz. Phosphatgemisch, 0,005 Proz. Magnesiumsulfat und 0,5 Proz. Natriumacetat enthielt, die also keinerlei Stickstoffsubstanzen enthielt, konnte der Timotheebazillus in der Tat, wenn auch sehr langsam und mühsam, in Passagen wachsen. Es gelang zwar nicht, bei jeder Abimpfung Wachstum zu erzielen, aber bei wiederholten Versuchen war es möglich, den Timotheebazillus in fünf Passagen zu züchten. Er bildete ein sehr zartes Häutchen, das nach längerer Zeit den größten Teil der Nährbodenoberfläche bedeckte. Wir hatten natürlich Verdacht gehabt, daß die zu der Nährlösung benutzten Substanzen geringe Mengen stickstoffhaltiger Stoffe enthalten könnten. Wir baten deshalb Herrn Privatdozent Dr. *Laquer*, dem wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank sagen möchten, um die Untersuchung der verwendeten Salze auf stickstoffhaltige Beimengungen. Wie er uns mitteilte, gelang es ihm mit Mikromethoden nicht, solche Verunreinigungen nachzuweisen. Es ist deshalb anzunehmen, daß der Timotheebazillus mit den stickstoffhaltigen Substanzen auskommt, die er aus der Brutschrankluft beziehen kann. Um die hier vorgebrachten Tatsachen sicherzustellen, haben wir noch Versuche an Nährlösungen angestellt, der sowohl Stickstoff- wie Kohlenstoffsubstanzen fehlten. Wir impften den Stamm in eine Nährlösung, die 0,5 Proz. NaCl, 0,2 Proz. Phosphatgemisch, 0,005 Proz. Magnesiumsulfat enthielt. Entsprechend unseren vorigen Versuchen konnten wir nachweisen, daß auch in dieser Nährlösung ein langsames, aber in Passagen fortführbares Wachstum möglich ist. Zur Ausführung von fünf Passagen haben wir allerdings die Zeit von einem halben Jahre bedurft. In solchen stickstoff- oder kohlenstofffreien Nährflüssigkeiten ist das Wachstum des Timotheebazillus beim Zutritt nicht gereinigter Brutschrankluft ein *sehr dürftiges* und *sehr langsames*. Es läßt sich daher unter Berücksichtigung der Schnelligkeit des Wachstums und der Üppigkeit der Kulturen der Verwendungsstoffwechsel untersuchen. Natürlich muß bei der Bewertung der Ergebnisse auf die beschriebene Fehlerquelle Rücksicht genommen werden.

A. Verwertung von Kohlenstoffquellen.

a) Organische Säuren.

Zunächst untersuchten wir eine Reihe *organischer Säuren* darauf hin, ob sie bei Anwesenheit von Ammoniak als einziger Stickstoffquelle vom Timotheebazillus verwertet werden können. Wir stellten uns eine Stammlösung her, die in 100 ccm doppelt destillierten Wassers 1 g NaCl, 1 g Ammoniumsulfat, 0,01 g Magnesiumsulfat, 0,4 g Kaliumphosphat (1 Teil primäres und 3 Teile sekundäres Kaliumphosphat) enthielt. Diese Lösung wurde $\frac{1}{4}$ Stunde im Dampftopf sterilisiert und auf Reaktion geprüft. p_H betrug 7,1. Statt des Phosphatgemischs benutzten wir zu Anfang unserer Versuche nur Kaliumbiphosphat. Die Lösung mußte dann mit Sodalösung neutralisiert werden. Die zur Neutralisierung notwendigen Mengen von Soda kommen nach unseren Erfahrungen als Kohlenstoffquelle *nicht* in Betracht. Von den zu untersuchenden Kohlenstoffquellen wurden 1 proz. Lösungen hergestellt, eventuell neutralisiert und sterilisiert. Nachher wurden gleiche Mengen der Stammlösung mit gleichen Mengen der Lösungen der verschiedenen Kohlenstoffquellen zusammengemischt und 10 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Dadurch war der Gehalt an einzelnen Bestandteilen auf die Hälfte reduziert. Die benutzten Kohlenstoffquellen waren bei dieser Versuchsanordnung stets die *einzige* Kohlenstoff- und Energiequelle.

Als einfachste organische Kohlenstoffverbindung wurde die *Ameisensäure* gewählt. In einem Nährboden, der außer den oben erwähnten mineralischen Bestandteilen 0,5 Proz. Natriumformiat enthielt, wuchs der Timotheebazillus nicht.

Ein ausgezeichnetes Wachstum bot dagegen die *Essigsäure* dar. Der Nährboden enthielt 0,5 Proz. NaCl, 0,2 Proz. Phosphatgemisch, 0,5 Proz. Ammoniumsulfat und 0,5 Proz. Natriumacetat.

In diesem Nährboden gedieh der Timotheebazillus schnell. Es entwickelte sich ein weißliches Häutchen, das sich über die ganze Oberfläche der Nährflüssigkeit ausbreitete. Der Timotheebazillus ließ sich in dieser Nährlösung ohne Schwierigkeit in Passagen dauernd züchten. Mikroskopisch erwiesen sich die Stäbchen als säurefest. Die Essigsäure ist nach unseren Erfahrungen für den Timotheebazillus eine der besten Kohlenstoffquellen. Wichtig ist die *Quantität* des Acetats. Größere Mengen als die von uns verwendeten *hemmen* das Wachstum!

Dann prüften wir die *Oxalsäure*. In einem Nährboden, der die oben angeführten Bestandteile und als einzige Kohlenstoffquelle 0,5 Proz. oxalsaures Natrium enthielt, ließ sich zwar der Timotheebazillus züchten, die Kulturen entwickelten sich aber langsam und nicht üppig. Die Oberfläche des Nährbodens war meist nicht von einem zusammenhängenden Häutchen, sondern von isolierten Inselchen, die

das Aussehen von kreisrunden Kolonien hatten, bedeckt. Mikroskopisch waren die Stäbchen in ihrer äußeren Form nicht auffällig verändert, dagegen waren sie des öfteren nicht säurefest.

In einem Nährboden, der *milchsaures* Natrium als Kohlenstoffquelle enthielt, wuchs der Timotheebazillus gut und ließ sich in vielen Passagen fortpflanzen.

Bei der Prüfung der *Bernsteinsäure*, die wir mit Natriumcarbonat neutralisierten, zeigte sich, daß der Timotheebazillus diese organische Säure sehr gut verwerten kann.

Auch die *Äpfelsäure*, mit Natriumcarbonat neutralisiert, wurde gut assimiliert. Der Timotheebazillus wuchs darin schnell und üppig und war meist säurefest.

Was die *Weinsäure* betrifft, so ist das Wachstum mit ihr ein langsames und meist nicht sehr üppiges. Die Bakterien sind bei dieser Kohlenstoffquelle häufig sehr kurz, kokkenförmig, für gewöhnlich aber säurefest. Wir bedienten uns bei unseren Versuchen des weinsauren Natriums.

Was die dreibasische *Citronensäure* betrifft, so wuchs der Timotheebazillus in einer Nährlösung, die außer den Mineralbestandteilen $\frac{1}{2}$ Proz. Natrium citricum enthielt, sehr kümmerlich, und die Passagen rissen des öfteren ab. Um ihn fünf Passagen hindurch züchten zu können, bedurfte man der Zeit von 8 Monaten. Die Citronensäure stellt für den Timotheebazillus also eine schlechte Kohlenstoffquelle dar. Vielleicht handelt es sich dabei nur um eine Unfähigkeit *unseres* Stammes, denn einige andere säurefeste Saprophyten verwerteten die Citronensäure besser (s. Tabelle III).

b) Alkohole.

Soweit flüchtige Alkohole benutzt wurden, haben wir die Wattebäusche der Kölbchen paraffiniert, um das Entweichen des Alkohols zu verhindern. Allerdings war dadurch die Sauerstoffzufuhr in erheblichem Maße gestört oder sogar aufgehoben. Wie uns aber entsprechende Kontrollversuche mit gut ausnutzbaren Kohlenstoffquellen, z. B. mit Acetat, gezeigt haben, genügte die im Kölbchen eingeschlossene Sauerstoffmenge zum Wachstum.

Was zunächst den *Methylalkohol* betrifft, so konnte gelegentlich in der ersten Passage ein kümmerliches Wachstum des Timotheebazillus beobachtet werden, doch ließen sich Passagen nicht ausführen.

Eine gute Kohlenstoffquelle stellt dagegen der *Äthylalkohol* dar. In einem Nährboden, der die nötigen mineralischen Bestandteile enthält, Ammoniak als Stickstoffquelle und 0,5proz. Äthylalkohol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle, wächst der Timotheebazillus üppig und schnell und läßt sich dauernd in Passagen fortzüchten.

Amylalkohol wurde in 0,5proz. Konzentration nicht verwertet.

Das *Glycerin* wird vorzüglich assimiliert. Wird es der Nährlösung, die die nötigen mineralischen Bestandteile und Ammoniak enthält, in ½proz. Menge zugefügt, so wächst der Timotheebazillus darin üppig und schnell. Er bildet eine gelblichweiße Haut, und die Stäbchen sind zum Teil säurefest, zum Teil lassen sie sich bei der Ziehl-Neelsenfärbung entfärben.

Mannit wird vom Timotheebazillus ebenfalls verwertet. Das Wachstum ist manchmal kein sehr üppiges, und es dauert längere Zeit, bevor sich ein weißliches Häutchen gebildet hat. Es gelang aber trotzdem ohne Schwierigkeiten, ihn in fünf Passagen mit Mannit als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu züchten.

c) Kohlenhydrate.

Was die Kohlenhydrate betrifft, so haben wir von diesen *Traubenzucker*, *Lävulose*, *Milchzucker*, *Saccharose* und *Maltose* verwendet.

Mit *Traubenzucker* und *Lävulose* als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle ließ sich der Timotheebazillus in Passagen züchten. Das Wachstum war öfters kein üppiges, doch bei längerer Bebrütung entwickelte sich eine weißlich-gelbliche Haut, die aus zum Teil säurefesten Stäbchen bestand.

Sterilisierte man die *Milchzucker-*, *Saccharose-* und *Maltose*lösungen im Dampfe, so konnte man öfters ein Wachstum des Timotheebazillus beobachten. Stellte man sich dagegen die Lösungen dieser Kohlenhydrate durch *Filtration* keimfrei her (*de Haen*sche Filter), so assimilierte sie der Timotheebazillus *nicht*. Daraus geht hervor, daß dieser Mikroorganismus Saccharose, Lactose und Maltose *nicht* anzugreifen vermag, und daß in den erhitzten Lösungen nur die entstandenen Spaltprodukte dieser Kohlenhydrate verwertet werden.

B. Verwertung von Stickstoffquellen.

a) Ammoniak.

Daß der Timotheebazillus *Ammoniak* als Stickstoffquelle gut verwerten kann, geht bereits aus den vorhergehenden Versuchen mit den verschiedenen Kohlenstoffquellen hervor, und ist auch bereits von früheren Autoren festgestellt worden.

b) Nitrat.

Der Timotheebazillus vermag den Stickstoff nicht nur aus Ammoniak, sondern auch aus Nitrat zu gewinnen. Stellt man sich einen Nährboden her, der 0,5 Proz. NaCl, 0,005 Proz. Magnesiumsulfat, 0,2 Proz. Phosphatgemisch und 0,5 Proz. Natriumnitrat oder Kaliumnitrat als Stickstoffquelle enthält, so kann der Timotheebazillus bei

Anwesenheit von Acetat, Glycerin oder vor allem, wenn beide diese Kohlenstoffquellen in ½proz. Konzentration vorhanden sind, gut gedeihen.

c) Aminosäuren.

Bei der Prüfung der Aminosäuren gingen wir so vor, daß wir sie in einer Versuchsreihe als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, und in einer zweiten als Stickstoffquelle unter Hinzufügung einer besonderen Kohlenstoffquelle (milchsaures oder essigsaures Natrium) den Bakterien dargeboten haben. In der ersten Versuchsreihe gingen wir von einer stickstofffreien Stammlösung aus, der wir die Aminosäuren meist in ½proz. Konzentration zugesetzt haben. Die Stammlösung enthielt folgende Bestandteile: In 100 ccm doppelt destillierten Wassers wurden gelöst: 0,5 g NaCl, 0,2 g Kaliumbiphosphat, 0,1 g Magnesiumsulfat. Diese Lösung wurde mit Sodalösung neutralisiert.

Wurden zu dieser Stammlösung 0,5 g *Glykokoll* hinzugefügt, so wuchs darin der Timotheebazillus zwar nicht sehr üppig, aber doch in Passagen.

Auch mit *d-Alanin, l-Leucin, Natrium asparaginicum* und *Asparagin* und mit *glutaminsaurem* Natrium als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle gedieh der Timotheebazillus in Passagen, zuweilen sogar sehr üppig. Wurde der Stammlösung 0,05 Proz. *l-Tyrosin* zugesetzt, so ließ sich der Timotheebazillus darin in Passagen züchten. Er wuchs meistens nicht sehr üppig, und es dauerte längere Zeit, bis ein zartes Häutchen die Oberfläche der Nährflüssigkeit bedeckte.

In der zweiten Versuchsreihe haben wir der Nährflüssigkeit *außer der Aminosäure noch Milchsäure* als Kohlenstoffquelle hinzugefügt. Die Stammlösung enthielt in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,2 g Kaliumbiphosphat, 0,5 g Natriumlactat, und wurde mit Sodalösung neutralisiert. Die Aminosäuren wurden, mit Ausnahme von l-Tyrosin, in ½proz. Konzentration zugesetzt. Mit *d-Alanin, l-Leucin, asparaginsaurem* Natrium, *glutaminsaurem* Natrium und mit *l-Tyrosin* als Stickstoffquelle vermehrte sich der Timotheebazillus gut und zeigte bei d-Alanin und Glutaminsäure besonders üppiges Wachstum.

d) Andere Stickstoffquellen.

Wir prüften weiterhin, ob auch andersartige Stickstoff-Kohlenstoffverbindungen vom Timotheebazillus verwertet werden können. Von solchen Stoffen untersuchten wir den Harnstoff und die Harnsäure.

Das Wachstum in einem Nährboden, der *Harnstoff* als Stickstoff- und Natriumacetat als Kohlenstoffquelle enthielt, war ein ganz kümmerliches und außerordentlich langsames, so daß wir den Eindruck gewonnen haben, daß der Harnstoff als Stickstoffquelle nicht verwertet werden kann. Die Nährlösung enthielt in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl,

0,2 g Phosphatgemisch, 0,005 g Magnesiumsulfat, 0,5 g Natriumacetat und 0,5 g Harnstoff.

Bei *harnsaurem Natrium* als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle wuchs der Timotheebazillus zwar sehr mühsam, aber in Passagen.

C. Der Mineralstoffwechsel.

In den bereits oben zitierten, gemeinsam mit *C. E. Cahn-Bronner* an den Bakterien der Typhus-Koligruppe ausgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, daß diese Mikroorganismen ohne weiteres in einem schwefel- und magnesiumfreien Nährboden zu gedeihen vermögen und dauernd in Passagen züchtbar sind. In einem Nährboden, der in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,2 g Kaliumbiphosphat und 0,6 g Ammoniumlactat enthält und mit Natriumbicarbonat neutralisiert ist, läßt sich z. B. der Paratyphus-B-Bazillus *bei reichlichem Sauerstoffzutritt* dauernd fortzüchten.

Der Timotheebazillus vermag in einem solchen Nährboden bei reichlicher Einsaat aus bouillonhaltigem Nährboden anzuwachsen und sich sogar zwei oder drei Passagen fortzupflanzen, ein dauerndes Wachstum in Passagen ist aber in dieser Nährflüssigkeit *nicht* erzielbar.

Wie bereits die vorher besprochenen Versuche mit verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen gezeigt haben, ist die Fortpflanzung des Timotheebazillus dann möglich, wenn die Nährflüssigkeit Magnesiumsulfat enthält. Die zum Wachstum nötige Menge des Magnesiumsulfats ist eine relativ geringe. In einer Nährflüssigkeit, die in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,6 g Ammoniumacetat, 0,2 g sekundäres Kaliumphosphat enthält und dann mit Soda neutralisiert und alkalisiert ist, vermag der Timotheebazillus *nicht* in Passagen zu wachsen. Fügt man aber noch 0,005 g Magnesiumsulfat zu, so ist ein gutes Wachstum in Passagen möglich. Es war die Frage zu beantworten, ob zum Wachstum beide Elemente, Magnesium und Schwefel, notwendig sind, oder ob nur eines von diesen unbedingt erforderlich ist. Wir haben deshalb geprüft, ob in einer schwefelfreien Nährflüssigkeit Wachstum erfolgen kann. In eine Nährlösung, die in 100 ccm Wasser 0,5 g NaCl, 0,05 g Magnesiumlactat, 0,5 g Ammoniumlactat, 0,2 g Phosphatgemisch enthielt, wuchs der Timotheebazillus meist gar nicht, nur selten sehr langsam und kümmerlich. Durch wiederholtes Abimpfen gelang es, ihn in 5 Monaten fünf Passagen hindurch fortzuzüchten. Dabei muß berücksichtigt werden, daß geringe Schwefelmengen bei der ersten Überimpfung übertragen werden und daß auch durch Zerfall der Bakterien schwefelhaltige Stoffe frei werden, abgesehen davon, daß minimale Quantitäten von schwefelhaltigen Verbindungen als Beimengungen der benutzten Chemikalien vorhanden sein könnten.

Tabelle I. Die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen durch den Timotheebazillus.

Kohlenstoffquelle:	Ameisensäure	Essigsäure	Oxalsäure	Milchsäure	Bernsteinsäure	Äpfelsäure	Weinsäure	Citronensäure	Methylalkohol
Stickstoffquelle:	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak
Ergebnis	O	+	schw. +	+	+	+	schw. +	+?	O

Kohlenstoffquelle:	Äthylalkohol	Amylalkohol	Glycerin	Mannit	Traubenzucker	Lävulose	Lactose	Maltose	Saccharose
Stickstoffquelle:	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak
Ergebnis	+	O	+	+	+	+	O	O	O

Zeichenerklärung:
++ bedeutet üppiges Wachstum in Passagen.
+ bedeutet Wachstum in zahlreichen Passagen.
schw. + bedeutet schwaches Wachstum in Passagen.
O bedeutet kein Wachstum.
+? bedeutet Wachstum in der ersten Zucht, aber nicht dauernd in *Passagen* fortzüchtbar.
O? bedeutet, daß das Wachstum in mehrmaligen Versuchen einmal in der ersten Zucht eintrat, ein anderes Mal nicht. In Passagen nicht züchtbar.

Tabelle II. Die Verwertung verschiedener Stickstoffquellen durch den Timotheebazillus.

Stickstoffquelle:	Ammoniak	Kaliumnitrat	Glykokoll	d-Alanin	l-Leucin	Asparaginsäure	Asparagin	Glutaminsäure
Kohlenstoffquelle:	Essigsäure	Essigsäure						
Ergebnis	+	+	schw. +	+	+	+	+	+

Stickstoffquelle:	l-Tyrosin	d-Alanin	l-Leucin	Asparaginsäure	Glutaminsäure	l-Tyrosin
Kohlenstoffquelle:		Milchsäure	Milchsäure	Milchsäure	Milchsäure	Milchsäure
Ergebnis	schw. +	++	+	+	+	+

Zeichenerklärung wie Tabelle I.

Wurde diesem Nährboden 0,05 g Natriumsulfat zugesetzt, so erfolgte ein üppiges und schnelles Wachstum, so daß ungefähr innerhalb eines Monats fünf Passagen gezüchtet wurden.

Ohne *Phosphat* konnte der Timotheebazillus nicht gedeihen.

In kali- oder natriumfreien Nährlösungen ließ sich der Timotheebazillus in Passagen fortzüchten. Allerdings müssen wir erwähnen, daß in unseren orientierenden Versuchen nicht ausgeschlossen werden kann, daß geringe Mengen dieser beiden Elemente vorhanden waren, da wir gezwungen waren, gewöhnliche Glasgefäße, die Spuren von Alkali abgeben können, zu benutzen. Unsere kalifreie Nährlösung enthielt folgende Bestandteile: In 100 ccm aqua dest. wurden gelöst: 0,5 NaCl, 0,5 g Ammoniumsulfat, 0,2 g primäres Natriumphosphat, 0,005 g Magnesiumsulfat und 0,5 g Natriumacetat und mit Sodalösung auf p_H 7,1 gebracht. Die natriumfreie Lösung bestand aus 0,6 Proz. Ammoniumlactat, 0,2 Proz. Phosphatgemisch (primäres und sekundäres Kaliumphosphat), 0,005 Proz. Magnesiumsulfat.

Auf alle Fälle zeigen unsere Versuche, daß der Timotheebazillus entweder mit Kalium allein oder mit Natrium allein auskommt, oder daß ihm die stets vorhandenen Spuren von Natrium und Kalium zum Wachstum genügen.

II. Teil.

Der Verwendungsstoffwechsel einiger anderen säurefesten Saprophyten.

(*Butterbazillus Rabinowitsch*, *Butterbazillus Korn II*, *Butterbazillus Petri*, *Milchbazillus*, *Harnbazillus*, *Trompetenbazillus*.)

Es lag uns daran, zu untersuchen, ob die am Timotheebazillus festgestellten ernährungsphysiologischen Eigenschaften auch bei anderen säurefesten Saprophyten vorhanden sind. Herrn Geheimrat *Kolle* und Herrn Dr. *Schlossberger* verdanken wir einige Kulturen solcher Bakterien, und zwar den Butterbazillus *Petri*, Butterbazillus *Rabinowitsch*, Butterbazillus *Korn II*, einen aus dem menschlichen Harn gezüchteten säurefesten Bazillus, einen säurefesten Milchbazillus und den Trompetenbazillus.

Bei der Untersuchung dieser Saprophyten haben wir uns auf die Beantwortung prinzipieller Fragen beschränkt. In so eingehender Weise, wie wir den Verwendungsstoffwechsel des Timotheebazillus geprüft haben, untersuchten wir die hier erwähnten säurefesten Saprophyten nicht. Vor allem konnten nicht alle beim Timotheebazillus verwendeten Nährstoffe untersucht werden. Wie gleich vorweg genommen werden mag, haben sich *prinzipielle* Unterschiede zwischen diesen Saprophyten und dem Timotheebazillus in den wesentlichen Merkmalen ihres Verwendungsstoffwechsels *nicht* ergeben.

Was zunächst den Mineralstoffwechsel betrifft, so zeigte sich auch bei diesen Saprophyten, daß die Anwesenheit von Magnesiumsulfat

für den Stoffwechsel von großer Bedeutung ist. Es ließ sich zwar in einem Nährboden, der Na Cl, Kaliumbiphosphat und Ammoniumlactat in den mehrfach schon erwähnten Mengen enthielt, der Butterbazillus *Petri*, der Butterbazillus *Rabinowitsch* und der Butterbazillus *Korn II*, der Harnbazillus, der Milchbazillus in Passagen züchten, doch war das Wachstum außerordentlich mühsam und kümmerlich, und die Passagen rissen des öfteren ab. Der Trompetenbazillus erwies sich als besonders anspruchsvoll und ließ sich in einem derartigen Nährboden trotz wiederholter Versuche *nicht* züchten. Dagegen war das Wachstum in einem Nährboden, der außer den oben angeführten Stoffen Magnesiumsulfat enthielt, bei den drei Butterbazillenstämmen, dem Harn- und Milchsäurebazillus ein gutes. Innerhalb von einigen Wochen ließen sich fünf Passagen durchführen. Der Trompetenbazillus war auch in diesem magnesiumsulfathaltigen Nährboden anspruchsvoll. Er wuchs nur kümmerlich und langsam, und es bedurfte eines halben Jahres, um ihn einige Passagen hindurch fortzuzüchten, wobei das Wachstum sowohl bei 22° wie bei 37° oft langsam eintrat und außerordentlich spärlich war.

Als besonders charakteristisch für den Timotheebazillus gegenüber den Bakterien der Typhus-Koligruppe ist die Tatsache, daß er mit Essigsäure und vor allem mit *Äthylalkohol* als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle ein gutes Wachstum zeigte. Wie wir nun aus den folgenden Mitteilungen ersehen werden, können die Kaltblüter- und Warmblütertuberkelbazillen *Äthylalkohol* als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle *nicht* verwerten. Wir haben deshalb die hier behandelten säurefesten Saprophyten darauf hin untersucht, ob sie Äthylalkohol zu assimilieren imstande sind.

In einem Nährboden, der Na Cl, Kaliumbiphosphat, Magnesiumsulfat und ½proz. *Äthylalkohol* enthielt und mit Sodalösung neutralisiert und schwach alkalisiert war, wuchsen die säurefesten Saprophyten sowohl bei 22° wie bei 37° gut. Schwierigkeiten bereitete auch hier nur der Trompetenbazillus, bei dem die Passagen gelegentlich abrissen. Was die Verwertung des *Acetats* in 0,5proz. Konzentrationen betrifft, so wuchsen alle säurefesten Saprophyten mit demselben gut. Der Trompetenbazillus gedieh auch mit Acetat häufig sehr kümmerlich.

Als eine bemerkenswerte Eigenschaft des Timotheebazillus haben wir weiterhin seine Anspruchslosigkeit in bezug auf die Stickstoff- und Kohlenstoffquelle festgestellt. Deshalb haben wir auch den Butterbazillus *Petri* und den Milchbazillus in dieser Richtung untersucht. In den beim Timotheebazillus erwähnten stickstoff- und kohlenstofffreien Nährböden verhielt sich der Butterbazillus *Petri* folgendermaßen: Im kohlenstofffreien Nährboden, der Ammoniak als Stickstoffquelle und die Mineralstoffe Mg, S und P enthielt, wuchs er in

Passagen. In 3 Monaten konnte er fünf Passagen hindurch gezüchtet werden. Es bildete sich an der Oberfläche des Nährbodens ein sehr zartes Häutchen, gelegentlich nur einzelne Inseln. Im stickstofffreien Nährboden, der Essigsäure als Kohlenstoffquelle enthielt, ließ er sich ebenfalls in Passagen, wenn auch sehr mühsam, fortzüchten. Im stickstoff- und kohlenstofffreien Nährboden, der also nur die notwendigen Mineralstoffe enthielt, war das Wachstum besonders kümmerlich und langsam, ließ sich aber doch im Laufe von 4 Monaten in Passagen fortführen. Die Nährbodenoberfläche bedeckte ein sehr zartes Häutchen, das häufig nur bei der Betrachtung der Kölbchen von *unten* als ein Schleier sichtbar war; die Stäbchen waren aber zum Teil sogar säurefest. Der untersuchte Milchbazillus verhielt sich in diesem Nährboden ähnlich. Es vermögen also auch diese Saprophyten mit den in der Brutschrankluft vorhandenen stickstoff- und kohlenstoffhaltigen Substanzen auszukommen.

Tabelle III.

Die Verwertung einiger für den Verwendungsstoffwechsel charakteristischen Kohlenstoffquellen durch säurefeste Saprophyten.

Kohlenstoffquelle:	Äthylalkohol	Essigsäure	Milchsäure	Citronensäure
Stickstoffquelle:	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak	Ammoniak
Butterbazillus *Petri*	+	+	+	+ sehr langsam
Butterbazillus *Korn II*	+	+	+	+ sehr langsam
Butterbazillus *Rabinowitsch* . . .	+	+	+	+ sehr langsam
Säurefester Milchbazillus . . .	+	+	+	+
Säurefester Harnbazillus . . .	+	+	+	+ langsam
Trompetenbazillus .	+ sehr langsam	+ sehr langsam	schw. + sehr langsam	+ ?

Zeichenerklärung wie Tabelle I.

Den Butterbazillus *Petri* züchteten wir mehrmals in *allen* den Nährböden, die wir beim Timotheebazillus besprochen haben, allerdings nicht immer in Passagen. Unterschiede gegenüber dem Verhalten des Timotheebazillus konnten *nicht* festgestellt werden.

In der folgenden Mitteilung werden wir den Verwendungsstoffwechsel der Kaltblütertuberkelbazillen besprechen.

Beitrag zur Chemie der Gaucherschen Krankheit.

Von

Emil Epstein.

(Aus der Prosektur des Franz Joseph-Spitales in Wien, dem Laboratorium der österreichischen Serumwerke in Wien und dem medizinisch-chemischen Universitätsinstitut in Graz.)

(Eingegangen am 6. Januar 1924.)

Die vorliegende Mitteilung bringt das Chemische als wesentliche Ergänzung eines gleichzeitig für die Veröffentlichung in *Virchows* Archiv eingereichten Beitrages zur Pathologie der Gaucherkrankheit. Es sei daher an dieser Stelle nur das Wichtigste über die Erscheinungsform dieses bisher als Splenomegalie vom Typus *Gaucher* bezeichneten Krankheitszustandes in wenigen Worten zusammengefaßt; bezüglich aller histologischen und pathologischen Details, sowie der zugehörigen Literaturangaben sei auf die genannte Publikation verwiesen.

Die Gaucherkrankheit ist klinisch durch eine abnorm vergrößerte Milz und eine meist ziemlich beträchtliche Anämie (ohne charakteristischen Blutbefund) gekennzeichnet. Histologisch finden sich in Milz, Leber, Lymphdrüsen und Knochenmark höchst auffällige rundliche, große Zellen. Die äußerst schwach gefärbte Leibessubstanz dieser Zellen, die weiterhin kurzweg als Gaucherzellen (G. Z.) bezeichnet werden sollen, zeigt häufig schon bei mittelstarker Vergrößerung vakuoläre Beschaffenheit, insbesondere bei Immersionsbetrachtung sieht man kleinere oder größere Vakuolen, oft auch große und kleinste in dichtem Nebeneinander. Diese Vakuolen sind aber nicht „leer“, sondern enthalten eine färberisch darstellbare homogene Substanz. Die in das Zellinnere eingedrungene, anscheinend stark quellende Substanz imbibiert das Protoplasma, indem es dieses zu einem Netzwerk auseinanderdrängt. Unter geeigneten physikalischen Bedingungen konfluiert dann die Substanz an einzelnen Stellen des Zellinnern zu unregelmäßig begrenzten, kleinen oder umfänglicheren, tropfigen Einlagerungen, welche auf solche Weise dann einen „vakuolären“ Bau der Zelle vortäuschen. Diese Zellen treten insbesondere in der Milz in großen Massen auf und ihre Anwesenheit führt zu einem Milztumor von oft ganz enormen Umfang und Gewicht.

Die chemische Beschaffenheit der eingelagerten Substanz hat seit Entdeckung der *Gaucher*schen Krankheit das wissenschaftliche Interesse in hohem Maße in Anspruch genommen. *Eppinger*[1]) bringt in diesem Sinne eine Reihe neuerer Befunde über das Verhältnis der *Milz* bzw. des retikulo-endothelialen Systems zum *Fettstoffwechsel* mit den Befunden bei der *Gaucher*schen Splenomegalie in Beziehung, indem er auf die Ergebnisse der Arbeiten von *Pocharinski*[2]), *Kusunoki*[3]), *Schulze*[4]), *Lutz*[5]), *Kawamura*[6]) und *Anitschkow*[7]) hinweist.

Unleugbar besteht eine gewisse morphologische Ähnlichkeit der G. Z. mit den als Lipoidphagocyten bekannten Zelltypen. Zu diesen Lipoidphagocyten zählen die von *Stoerk* und *Landsteiner*[8]) (1904) bei Malakoplakie der Harnblase beschriebenen Makrophagen, die *Xanthomzellen* von *Pinkus* und *Pick*[9]) (1908) und die Lipoidzellen der pathologisch veränderten Nieren, auf die *Löhlein*[10]) (1905) und *Stoerk*[11]) (1906) hingewiesen haben. Weiter machten *Pinkus* und *Pick*[9]) auf die veränderten Zellen aufmerksam, welche sich in den opaken, tumorartigen bis bohnengroßen Einschlüssen in den Plexus chorioidei vorfinden.

Es scheint also, daß die angeführte, wenn auch entfernte morphologische Ähnlichkeit, welche vorwiegend in der Transparenz des Zellprotoplasmas zum Ausdrucke kommt, dazu geführt hat, daß das Hauptaugenmerk der Forschung ungeachtet der Ansichten von *Schlagenhaufer*[12]), *Riesel*[13]) und von *Erik Johannes Kraus*[14]), welche die eingelagerte Substanz als eine eiweißartige angesehen hatten, bis in die allerjüngste Zeit dahin gerichtet war, die Lipoidnatur der gespeicherten Substanz bei der Gaucherkrankheit zu erweisen, wobei man sich im allgemeinen der histochemischen Untersuchungsmethode bediente.

Erst *Mandlebaum* und *Downey*[15]) haben den Versuch unternommen, durch chemisch-analytische Untersuchungstechnik Anhaltspunkte für die Zusammensetzung der Gauchersubstanz zu gewinnen, indem sie Gemische von Alkohol-, Chloroform-, Äther- und Acetonextrakten untersuchten. Der Weg, den sie hierbei eingeschlagen hatten, Mischextrakte zu ihren Untersuchungen heranzuziehen, muß aber als ungeeignet bezeichnet werden,

---

[1]) *Eppinger*, Die hepato-lienalen Erkrankungen. Verlag Julius Springer, Berlin 1920.
[2]) *Pocharinski*, Zieglers Beitr. **54**, 1912.
[3]) *Kusunoki*, ebendaselbst **59**, 1914.
[4]) *Schulze*, Verh. d. deutsch. pathol. Ges. **15**, 1912.
[5]) *Lutz*, Zieglers Beitr. **58**, 1914.
[6]) *Kawamura*, Cholesterinesterverfettung. Jena 1911.
[7]) *Anitschkow*, Zieglers Beitr. **57**, 1914.
[8]) *Stoerk* und *Landsteiner*, Zieglers Beitr. **33**, 1914.
[9]) *Pinkus* und *Pick*, Deutsch. med. Wochenschr. 1908.
[10]) *Löhlein*, Virchows Arch. **180**, 1905.
[11]) *Stoerk*, Sitzungsber. d. k. k. Akad. d. Wissensch. **115**, H. 12, 1906.
[12]) *Schlagenhaufer*, Virchows Arch. **187**, 1907.
[13]) *Riesel*, Zieglers Beitr. **46**, 1909.
[14]) *Erik Johannes Kraus*, Zeitschr. f. angew. Anat. u. Konstitutionslehre **7**, 1920.
[15]) *Mandlebaum* und *Downey*, Fol. hämatol. Arch. **20**, 1915.

so daß ihre Resultate für die Beurteilung dieser Frage nicht in Betracht zu ziehen sind.

Sodann haben *Wahl* und *Richardson*[1]) einen Fall von *Gaucher*scher Krankheit bei einem Kinde mittels der Extraktionsmethode nach *Fränkel* und *Erlandsen* chemisch untersucht und sind zu dem Schluß gekommen, daß die mit Osmium darstellbaren Fette („fixed fat") der Milz im Vergleich zur Norm vermindert, Cholesterin und Lecithin vermehrt seien.

Ferner berichtet *Siegmund*[2]) über den chemischen und mikrochemischen Nachweis von Lipoiden, und zwar zum größten Teile von Phosphatiden in Milz, Knochen und Lymphdrüsen bei einem 9 Monate alten, an *Gaucher*scher Krankheit verstorbenen Mädchen. Es gelang ihm, mit einer Reihe von *Lipoidfärbungen*, und zwar insbesondere nach *Smith-Dietrich* und mittels *Markscheidenfärbung* den Lipoidnachweis zu erbringen. Die fragliche Substanz läßt das Phänomen der Doppelbrechung vermissen und verhält sich gegen andere Lipoidfärbungen refraktär. Die quantitative Bestimmung der durch Äther, Alkohol und Chloroformextraktion gewonnenen Gesamtlipoide der Gauchermilz ergab 11,6 Proz. gegen 1,1 Proz. der Normalmilz, die auf Lecithin berechneten Phosphorwerte 6,4 gegen 0,08 Proz. der Normalmilz. Die Prozentzahlen sind auf frisches Ausgangsmaterial berechnet. *Siegmund* schließt daraus, daß es sich um eine Infiltration der Milz mit Lipoiden der *Phosphatidgruppe* handelt, und setzt sie in *Beziehung zur experimentellen Speicherung doppelt brechender Cholesterinester* in der Milz *cholesteringefütterter Kaninchen*, die er als „*Lipoidhyperplasie*" bezeichnet. Die bisher veröffentlichten Fälle mit negativem Ausfalle der histochemischen Untersuchung auf Lipoide würden nach *Siegmund* nur anderen Stadien des prinzipiell gleichartigen Vorganges entsprechen, wobei es seiner Ansicht nach zur Umwandlung aufgespeicherter Fettsubstanzen kommen könne.

H. Lippmann[3]) bespricht in der Sitzung der Berliner medizinischen Gesellschaft vom 11. Oktober 1922 einen Fall von Gaucherkrankheit, bei dem die Diagnose durch histologische Untersuchung des Milzpunktates festgestellt erscheint. *Lippmann* ist nicht in der Lage, auf Grund seiner chemischen Untersuchungen des Blutes eine „Lipoidablagerung in den Zellen als Ursache der ganzen Affektion anzusprechen". Von einer regulären Vermehrung der Cholesterinester, wie sie *Eppinger* berichtet, könne keine Rede sein. *L. Pick*[4]) erwähnt in derselben Sitzung drei Sektionsfälle und gibt seiner Ansicht dahin Ausdruck, daß das eigenartige Aussehen der G. Z. beim Versagen aller analysierenden Reaktionen bei schwach positivem Ausfall der Eiweißreaktionen (mit *Millons* Reagens oder Xantoproteinreaktion) auf einen besonderen, noch unbekannten Eiweißkörper zurückzuführen sei.

Aus den Angaben der vorliegenden einschlägigen Literatur ergibt sich somit, daß die Ansichten über die chemische Beschaffenheit des eigenartigen, in den G. Z. gespeicherten Stoffkomplexes keineswegs geklärt erscheinen.

---

[1]) *Wahl* und *Richardson*, Arch. of intern. med. 17, 1916.

[2]) Verh. d. deutsch. pathol. Ges. 1921 (18. Tagung).

[3]) Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 44, S. 1495, 1922; Med. Klin. Nr. 51, 1922.

[4]) Ebendaselbst Nr. 44, S. 1408.

In folgender Mitteilung soll nun auf Grund eigener histochemischer und chemisch-analytischer Untersuchungen versucht werden, zu dieser Frage von neuem Stellung zu nehmen.

Histochemischer Teil.

Zunächst wurde die chemische Identifizierung des Stoffkomplexes auf dem Wege *histochemischer Reaktionen* in Angriff genommen. Die nachfolgenden Befunde reichen bis in das Jahr 1915 zurück.

An Zupfpräparaten aus der Milz des damals von mir sezierten Falles, über den ich in dem eingangs erwähnten Beitrag berichte, erschien das Protoplasma der G. Z. von mattglänzenden, rundlichen Gebilden unregelmäßiger Gestalt und verschiedener Größe dicht durchsetzt, welche sich bei Behandlung mit Säuren (Essigsäure, Salzsäure) in keiner Weise veränderten, bei Zusatz von Äther jedoch unleugbar an Klarheit der Umrisse einbüßend, ein sehr verschwommenes Bild zeigten.

Ferner wurden *Gefrier-* bzw. *Paraffinschnitte* mit den bekannten Fett- und Lipoidfärbungsmethoden untersucht. (Diese Untersuchungen beziehen sich durchaus auf ein in 10proz. wässeriger Formalinlösung fixiertes Material.) Die Behandlung der Präparate mit Über-*Osmiumsäure* zeigte die Zellen selbst frei von Neutralfett. In den Leberpräparaten waren in einzelnen Leberzellen Fetteinlagerungen, jedoch stehen dieselben mit den G. Z.-Nestern in keinem wie immer gearteten Zusammenhang. Im *Sudan*-Präparate lassen die G. Z. eine Andeutung von diffusem rötlich-gelblichem Farbenton erkennen.

Die Färbung nach *Lorrain-Smith* zeigt die Zellen in einem diffusen, bräunlichgelben Farbenton. Ebenso hat die *Weigert*sche Markscheidenfärbung in der *Pal*schen Modifikation in bezug auf den Vakuoleninhalt der G. Z. ein negatives Ergebnis.

Mittels der *Nilblausulfatmethode* nach *Lorrain-Smith* gefärbt, nach welcher sich die Fettsäuren als dunkelblaue, glänzende Tropfen hervorheben, die Neutralfette rot erscheinen, zeigt das Zellprotoplasma der G. Z. nur einen diffus blaßblauen Farbenton, Neutralfette sind in den Zellen nicht nachweisbar. Ebenso refraktär verhalten sich die Zellen bei der Behandlung der Gefrierschnitte nach *Fischler*. Die mikroskopische Untersuchung von Gefrierschnitten bei *gekreuzten Nicols* zeigt gelegentlich mäßig reichliche, hell aufleuchtende Körnchen und Tröpfchen, die fast ausschließlich *extra*zellulär liegen, hier und da aber doch, und zwar recht vereinzelt auch im Protoplasmaleib der G. Z. eingeschlossen erscheinen.

Da nach *Schultze* die oxydativen Fermente unter anderem auch für den Stoffwechsel der Fette eine Rolle spielen, wurde auch das Verhalten bei Anwendung der Oxydasereaktion nach *Winkler* und *Schultze* geprüft. Das Ergebnis war ein negatives.

Nach den so gut wie negativen Ergebnissen der tinktoriellen histochemischen Reaktionen versuchte ich dann noch die Anwendung der chemischen Reaktionen auf Cholesterin und Phosphatide.

Eine Untersuchung von Zupfpräparaten mittels der alten *Salkowski*schen Methode auf Cholesterin unter Zusatz von Chloroform und Schwefelsäure ergab mikroskopisch eine Spur Rosafärbung der Chloroformtropfen. Ferner extrahierte ich ein Stückchen Milz mit Aceton, dampfte den Acetonextrakt auf dem Wasserbade bis zur öligen Konsistenz ein und war nun in

der Lage, vereinzelte *Cholesterintafeln* nachzuweisen, die nach Zusatz von Schwefelsäure und Chloroform (*Salkowski*), ferner von Jod und Schwefelsäure und endlich von Formalin und Schwefelsäure (*Golodetz*) die typischen Farbenreaktionen ergaben. Das nach Acetonextraktion restierende Material extrahierte ich neuerlich mit Äther und konnte in dem Abdampfungsrückstand in der Soda-Salpeterschmelze mit molybdänsaurem Ammon und Salpetersäure Phosphor in geringen Spuren nachweisen. Es ergibt sich also aus diesen Reaktionen, daß in der Milz unseres Falles spärliche Mengen Cholesterin und Phosphor qualitativ nachzuweisen waren. Mit diesem Befund ist aber eigentlich der Inhalt der positiven diesbezüglichen Ergebnisse erschöpft, wobei noch sehr zu bezweifeln war, ob der positive Befund, insbesondere in Anbetracht der allgemeinen Verbreitung des Cholesterins und Phosphors im Organismus mit der eigenartigen intraprotoplasmatisch abgelagerten Substanz in Beziehung zu setzen ist.

Das Material der folgenden Untersuchungen stammt aus einer exstirpierten Milz eines zweiten Falles von Gaucherkrankheit[1]).

Ich habe zunächst versucht, ob die dem histologischen Befunde zugrunde liegenden Substanzen mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar sind oder nicht.

Gewebestückchen der *frischen* Milz wurden zunächst nach *Fränkel* mit Aceton entwässert, sodann nochmals mit heißem Aceton, ferner mit Äther und siedendem Alkohol mehrfach sorgfältig extrahiert. Gefrierschnitte, welche von den auf diese Weise vorbehandelten Gewebsstückchen herrühren, zeigten keine Veränderungen gegenüber Gefrierschnitten, welche von formalinfixierten, *nicht* extrahierten Stückchen angefertigt worden waren. Ferner wurden auch *formalinfixierte Gewebsstückchen*, sowie die von denselben hergestellten *Gefrierschnitte selbst* der eben beschriebenen Lipoidreaktion unterworfen und nach der üblichen Färbetechnik mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Auch diese Schnitte zeigten keine nennenswerten Veränderungen gegenüber Präparaten aus nicht extrahiertem Material.

Das Ergebnis dieser Versuche gab zunächst zu dem Schlusse Anlaß, daß die fragliche Substanz kaum den Lipoiden angehören dürfte, da sie durch keine der organischen Lipoidlösungsmittel extrahierbar schien. Es wurde daher nach Rücksprache mit Herrn Professor *Siegmund Fränkel* in Wien auf chemische Veränderungen im Eiweißanteile des Protoplasmas selbst nachgesehen. Zu diesem Zwecke wurde das Material der ursprünglich 1830 g schweren Milz nach Entfernung von etwa 50 g Gewebe für die histologischen Untersuchungen Herrn Professor Dr. *Siegmund Fränkel* übergeben, welcher dasselbe in dem ihm unterstehenden Institute der *Spiegler*schen Stiftung durch Herrn Dr. *Giuseppe Aiello* einer eingehenden Analyse unterziehen ließ. Herr *Aiello* bespricht das Ergebnis seiner Arbeit in einer ausführlichen Veröffentlichung[2]).

Aiello extrahiert die auf der Fleischmaschine feinstgeschabte und in Aceton eingelegte Milz erschöpfend mit Äther im Soxhletapparate und hierauf mit heißem Alkohol, so daß er alle Lipoide entfernt. Den Rückstand verreibt er auf einer Sodamühle zu feinstem Pulver und bestimmt die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Gruppen von Aminosäuren nach der Methode von *van Slyke*, wodurch er sich ein Bild über die Zusammen-

[1]) Fall 2 des in Virchows Arch. erscheinenden Beitrages „Zur Pathologie der Gaucherkrankheit".

[2]) Diese Zeitschr. **124**, 228, 1921.

setzung der Eiweißkörper zu verschaffen sucht. Es stellt sich heraus, daß die Eiweißkörper der Gauchermilz eine Verminderung speziell der Monoaminosäuren, ferner der Monocarbonsäure und des Tryptophans zeigen, während sämtliche Diaminocarbonsäuren vermehrt sind. Der Gesamtstickstoffgehalt der normalen Milz mit 12,3 Proz. entspricht einem weitaus höheren Werte als der der Gauchermilz (9,79 Proz.), letztere enthält also einen stickstofffreien oder stickstoffarmen Körper in großer Menge. *Aiello* fand weiterhin mit hydrolysiertem Pulver aus normaler Milz eine Reduktion, 3,22 Proz. Traubenzucker entsprechend, aus Gauchermilz eine Reduktion, 4,91 Proz. Traubenzucker entsprechend, was einer Zunahme von 52,8 Proz. Kohlehydrat gleichkommt, wodurch ein großer Teil der Stickstoffdifferenz zwischen Normal- und Gauchermilz erklärt erscheint.

Die Untersuchungen *Aiellos* scheinen demnach dahin zu deuten, daß die eigenartige intraprotoplasmatisch in die G. Z. eingelagerte Substanz einen stickstofffreien Körper unbekannter chemischer Konstitution enthalten dürfte, der in der Normalmilz nicht vorhanden ist, dagegen im Protoplasma der G. Z. auftritt und durch das Vorhandensein von Kohlehydratgruppen im Molekül charakterisiert wird und daß in der Gauchermilz Eiweißsubstanzen irgend eine Rolle spielen dürften, die eine von den Eiweißstoffen der Normalmilz abweichende Zusammensetzung aufweisen. Wenn also die Untersuchungen aus dem Institute Professor *Fränkels* zwar einen neuen und wichtigen Beitrag zur Kenntnis der Chemie der Gauchersubstanz gebracht hatten, so mußte man sich doch eingestehen, daß von einer erschöpfenden Lösung dieses Problems noch keine Rede sein könne. Es schien daher verlockend, als neues Material zur Verfügung stand, umfangreichere chemische Untersuchungen in Angriff zu nehmen, über deren Ergebnisse im folgendem berichtet sei.

Chemisch-analytischer Teil.

Gemeinsam mit Ing.-Chem. Dr. *Karl Lorenz*.

Die Richtung, die in diesen Arbeiten maßgebend war, ergab sich aus der Erwägung, daß die Ergebnisse der Untersuchungen, die *Aiello* am Milzpulver nach erschöpfender Extraktion mit Aceton, Äther und Alkohol angestellt hatte, unbedingt einer Ergänzung dahin bedürfen, auch die Extrakte selbst chemisch zu analysieren und sie mit den Ergebnissen der Analyse von Extrakten aus Normalmilz zu vergleichen, da der negative Ausfall meiner histochemischen Untersuchungen nicht genügen kann, daß daraus endgültige Schlüsse auf die Natur der in den G. Z. gespeicherten Substanz gezogen werden.

In Arbeit genommen wurde die exstirpierte Milz einer 35jährigen Patientin, bei welcher die klinische Diagnose ursprünglich auf Morbus Banti gestellt worden war.

Hervorzuheben wäre, daß die Schwestern der Patientin ähnliche klinische Symptome (Milztumor usw.) bieten sollen. Der erwähnte Zustand der Patientin gab die Indikation zur Exstirpation der Milz, welche anfangs 1920 erfolgte.

Die exstirpierte Milz wog 1830g und zeigte die Masse 29,5 × 8,5 × 12cm. Die Kapsel der Milz erschien glatt und ziemlich gespannt, an keiner Stelle getrübt oder auffällig verdickt. Ihre Konsistenz ist eine mäßig feste.

Die *mikroskopische Untersuchung* ergab das charakteristische Bild einer *Splenomegalie Typ Gaucher.* Das zur Verfügung gestellte Material wurde *lediglich vom Gesichtspunkte* aus weiter verarbeitet, um nähere Aufschlüsse über die *chemische Natur der intraprotoplasmatisch abgelagerten, eigentümlich transparenten Substanz der Gauchermilz zu erhalten.*

Die Milz wurde durch die Fleischmaschine geschickt, der Fleischbrei auf Glasplatten gestrichen und bei 45° C im Luftstrome rasch und exakt getrocknet. Von einer Extraktion mit Aceton behufs Entwässerung wurde Abstand genommen.

Das Gauchermilzpulver wurde in mehreren Proben eingewogen und getrennt quantitativ untersucht, einerseits, um zu einwandfreien Durchschnittswerten zu gelangen, andererseits, um die Resultate durch gegenseitige Kontrolle überprüfen zu können. Um auch bei Normalmilzen zu brauchbaren Durchschnittswerten zu gelangen, wurden mehrere Normalmilzen in der gleichen Weise behandelt, da bei dem geringen Gewicht der Normalmilzen (150 bis 350 g) eine einzelne Normalmilz zu wenig Trockenpulver lieferte.

Die Proben wurden einzeln einer erschöpfenden Ätherextraktion im Soxhletapparate unterworfen. Jede Extraktion dauerte 4 bis 5 Tage.

Die ätherischen Extrakte waren leichtflüssig und hellbraun gefärbt.

Ich darf es unterlassen, im folgenden die Resultate der Einzeluntersuchungen anzuführen, und beschränke mich, die Durchschnittswerte unserer Analysen bzw. der Werte einzelner Musteranalysen anzuführen, die in folgenden Tabellen enthalten sind.

Tabelle I.

Absolute Gewichte der Extraktabdunstungsrückstände in der eingewogenen Menge Trockenpulvers und die Prozentzahlen auf 100 g Trockenmilzpulver berechnet.

Ausgangsmaterial	Eingewogene Menge	Ätherabdunstungsrückstand		Abdunstungsrückstand der 40°-Alkoholfraktion		Abdunstungsrückstand der Siede-Alkoholfraktion		Summe der Alkoholfraktionen	In Äther und Alkohol lösliche Substanzen	In Äther und Alkohol unlösl. Substanzen
	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
Normalmilz	16,82	1,28 =	7,61	1,707 =	10,14	0,354 =	2,1	12,24	19,85	80,15
Gauchermilz	25,25	1,69 =	6,7	6,79 =	25,5	2,386 =	9,45	34,95	41,65	58,35

Tabelle II. Prozentzahlen für Stickstoff- und Phosphorwerte in bezug auf die Gewichte der Abdunstungsrückstände.

Ausgangsmaterial	Ätherverdunstungsrückstand		Alkoholverdunstungsrückstand der 40°-Fraktion		Alkoholverdunstungsrückstand der Siedefraktion	
	Stickstoff Proz.	Phosphor Proz.	Stickstoff Proz.	Phosphor Proz.	Stickstoff Proz.	Phosphor Proz.
Normalmilz	1,31	0,7	6,62	1,4	8,05	1,1
Gauchermilz	1.4	0,82	6.69	0,87	8,61	0,49

Zunächst wurden die den eingewogenen Mengen Trockenpulvers entsprechenden Ätherextrakte abgedunstet und der Ätherabdunstungsrückstand gewogen.

Auf 100 g Trockenpulver berechnet, ergab sich für Normalmilz der Durchschnittswert von 7,61 Proz., für Gauchermilz der von 6,7 Proz.

Es zeigt sich also *kein wesentlicher Unterschied in den Quantitätsverhältnissen der mit Äther extrahierbaren Substanzen zwischen Gauchermilz und Normalmilz.*

Sodann wurden die Stickstoffwerte nach *Kjeldahl* und die Phosphorwerte nach *Schaumann-Neumann*[1]) im Abdunstungsrückstande des Ätherextraktes erhoben und in Prozenten dieser Rückstände angegeben. Zu diesem Zwecke wurden je 100 ccm Extrakt am Wasserbade eingeengt, der Abdunstungsrückstand zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet und gewogen. Es ergab sich ein Stickstoffwert von 1,36 Proz. und ein Phosphorwert von 0,7 Proz. für Normalmilz, ein Stickstoffwert von 1,4 Proz. und ein Phosphorwert von 0,82 Proz. für Gauchermilz, was einem ungefähren Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor wie 5 : 1 entspricht.

Die bisherigen Resultate scheinen zunächst keine Anhaltspunkte geliefert zu haben, daß irgendwie nennenswerte Mengen von Cholesterin oder Lecithin an dem Aufbau des als Gauchersubstanz bezeichneten Komplexes teilnehmen könnten, da sonst wohl eine beträchtliche Vermehrung dieser ätherlöslichen Substanzen in der Ätherfraktion nachweisbar gewesen wäre. Auch wenn man den in dieser Fraktion nachgewiesenen Phosphor in seiner Gänze auf Lecithin umrechnen wollte, so ergibt sich in absoluten Gewichtszahlen für 100 g Gauchermilztrockenpulver 1 g Lecithin, für 100 g Normalmilzpulver 1,2 g Lecithin.

Da somit die Extraktion mit Äther keine Aufklärung brachte, so lag es nahe, nachzusehen, ob nicht die sekundäre Extraktion des mit Äther primär erschöpfend extrahierten Pulvers mit 96proz. Alkohol irgendwelche Aufschlüsse zu bringen imstande wäre, wobei zunächst ein möglichst schonendes Verfahren angewendet wurde, indem wir bei 40° C bis zur nahezu völligen Erschöpfung des Pulvers an Substanzen, welche bei dieser Temperatur extrahierbar wären und erst hierauf mit siedendem Alkohol wieder bis zur völligen Erschöpfung des Milzpulvers extrahierten.

Die einzelnen Pulverproben wurden mit je 100 ccm 96proz. Alkohols stundenlang bei 40° bzw. Siedetemperatur extrahiert, der Alkohol für die 40°- und Siedefraktion in ein Sammelgefäß gegossen, das Pulver neuerdings mit 100 ccm Alkohol extrahiert usf., bis auf einem Probeuhrgläschen fast kein Abdunstungsrückstand mehr sichtbar wurde. Die so erzielten Alkoholextrakte wurden für die 40°-Fraktion und die Siedefraktion getrennt gesammelt.

[1]) Vgl. *Emil Abderhalden*, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 9. 616, 1919.

Beide Extraktfraktionen — sie seien der Kürze halber weiterhin als *40°-Fraktion* und *Siedefraktion* bezeichnet — wurden separat untersucht.

Die *40°*-Fraktionen von Normal- und Gauchermilz präsentieren sich als bernsteingelbe, durchsichtige Flüssigkeiten. Die 40°-Fraktion der *Gaucher*milz scheidet beim Abkühlen auf Zimmertemperatur eine gequollene, gelatinöse, farblose Masse in kugeligen Gebilden aus, die sich in der Wärme wieder lösen. Die 40°-Fraktion der *Normalmilz* läßt keine oder nur eine minimale wolkige Ausscheidung erkennen. In der Siedefraktion, insbesondere der Gauchermilz, aber auch in der der Normalmilz, setzen sich hingegen beim Abkühlen auf Zimmertemperatur reichlich weißliche, dichtwolkige Massen ab, die ziemlich rasch zu Boden sinken. Die 40°-Fraktion ist wesentlich konzentrierter (0,9 proz.) als die Siedefraktion (0,3proz.).

Es wurden nun wieder zunächst die den eingewogenen Mengen Trockenrückstandes entsprechenden alkoholischen Einzelfraktionen abgedunstet und die Rückstände gewogen (s. Tabellen I und II).

Auf 100 g Trockenpulver berechnet, ergab sich für die 40°-Fraktion Normalmilz ein Durchschnittswert von 10,14 Proz., für Gauchermilz ein Wert von 25,5 Proz.

Für die Siedefraktion von Normalmilz 2,1 Proz., für Gauchermilz 9,45 Proz. Für die Summe der Abdunstungsrückstände der alkoholischen Extraktfraktion (40°-Fraktion + Siedefraktion) für Normalmilz 12,24 Proz., für Gauchermilz 34,95 Proz., also fast die dreifache Menge alkoholextrahierbarer Substanz aus Gauchermilz gegenüber Normalmilz.

Es ergab sich für die 40°-Fraktion ein Stickstoffwert von 6,62 Proz. und ein Phosphorwert von 1,4 Proz. für Normalmilz, ein Stickstoffwert von 6,69 Proz. und ein Phosphorwert von 0,87 Proz. für Gauchermilz, für die Siedefraktion ein Stickstoffwert von 8,05 Proz. und ein Phosphorwert von 1,1 Proz. für Normalmilz, ein Stickstoffwert von 8,01 Proz. und ein Phosphorwert von 0,49 Proz. für Gauchermilz.

Auf den ersten Blick schienen auch diese aus den Alkoholfraktionen gewonnenen Prozentzahlen keine Anhaltspunkte für die Annahme von Phosphatiden in diesen Fraktionen geliefert zu haben. Da zwar durch die primäre Ätherextraktion Bestandteile der Gruppe der ungesättigten Phosphatide (Lecithine usw.) nahezu quantitativ entfernt worden sein dürften, wäre es immerhin noch möglich, daß Phosphatide der gesättigten Gruppe anwesend wären. Eine Umrechnung der gefundenen Prozentwerte für Phosphor auf Lecithin, dessen *empirische* Formel immerhin eine ziemliche Übereinstimmung mit den empirischen Formeln der bekannten Phosphatide der gesättigten Gruppe zeigt, gibt z. B. im Ätherextrakt Werte von 1 g Phosphatid der Gauchermilz gegen 1,2 g der Normalmilz, in der 40°-Alkoholfraktion 5 g Phosphatid der Gauchermilz gegen 3,24 g Phosphatid der Normalmilz und in der Siedefraktion 1,14 g Phosphatid der Gauchermilz gegen 0,52 g der

Normalmilz, sämtliche Gewichte berechnet auf den supponierten Phosphatidgehalt von 100 g Milztrockenpulver.

Weiter zeigt aber Tabelle II, daß in die 40°-Alkoholfraktion von *Gauchermilz* gegenüber *Normalmilz* die $2\frac{1}{2}$fache, in die Siedefraktion fast die *fünffache*, in beide Fraktionen zusammengenommen die *dreifache Menge* extrahierbare Substanz übergegangen ist, was zu dem Schluß berechtigt, daß die *Gauchersubstanz* wenigstens zu einem *beträchtlichen Anteil alkohollöslich* und in Berücksichtigung der in Ätherextrakte gewonnenen Werte in *Äther unlöslich* ist, daß somit die Untersuchungen der Alkoholfraktionen einen neuen, möglicherweise aussichtsreicheren Weg eröffnen könnten.

Es wurde zunächst eine qualitative Untersuchung der Alkoholfraktionen von Gauchermilzpulver angeschlossen, deren Ergebnisse in der Tabelle III eingetragen sind.

Allgemeine Eigenschaften.

Die am Wasserbade stark eingeengten Alkoholextraktfraktionen geben eine bräunliche gefärbte, durchsichtige, malzähnlich riechende, halbflüssige Masse. Zur Trockene abgedunstet, ergibt sich als Rückstand eine braune, trockene, aber hygroskopische Kruste, die beim Abkratzen mit dem Messer eine klebrige Beschaffenheit zeigt.

In Wasser aufgenommen, bildet der Abdunstungsrückstand der 40°-Fraktion eine trübe Flüssigkeit, während der der Siedefraktion in Wasser klar löslich ist.

Der Abdunstungsrückstand der 40°-Fraktion ist in Äther nur zum geringen Teile löslich.

Reaktion des in destilliertem Wasser aufgenommenen Rückstandes sowohl gegen Cochenille als gegen Lackmus schwach sauer.

Tabelle III.

	40°-Fraktion	Siedefraktion
Untersuchungen auf Eiweißabbauprodukte:		
Sulfosalicylsäureprobe	äußerste Spur, Trübung	negativ
*Millon*sche Reaktion	negativ	„
Biuretreaktion	„	„
Ninhydrinprobe	sehr stark positiv	sehr stark positiv
Chinonreaktion	schwach rosa	schwach rosa
„ auf Zusatz v. Soda	schwach violett	schwach violett
P. Ehrlichs Aldehydreaktion .	schwach rosa	—
Ammoniak (*Nesslers* Reagens)	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Untersuchungen auf sonstige Bestandteile:		
Cholesterin (Probe n. *Salkowski* und *Liebermann-Burchard*)	fehlt	fehlt
Cholin n. Angaben *Fränkels*[1])	vorhanden	—
Phosphor	„	—
Eisen	in Spuren	in Spuren
Schwefel	vorhanden	—

[1]) *Abderhalden*, Handb. d. biol. Arbeitsm. 1922, Abt. I, Teil 6, H. 1. S. 77

Die außerordentlich intensive Violettfärbung der Proben bei Anstellung der *Ninhydrinreaktion* schon bei Zimmertemperatur, die schwachen Farbenveränderungen der Proben bei der Chinon- und *Ehrlich*schen Aldehydreaktion ließen uns insbesondere in Erwägung der relativ hohen Stickstoffzahlen in den Extraktrückständen daran denken, daß etwa Aminosäuren als Abbauprodukte von Eiweißsubstanzen in den Extrakten vorhanden sein könnten. Aber der völlig *negative Ausfall der quantitativen Untersuchung auf Aminosäurestickstoff nach van Slyke* zeigte, daß höchstens ganz geringe Spuren dieser Substanzen in Betracht kommen können. Auch die minimale Trübung, die bei Zusatz von Sulfosalicylsäure zu den Extraktfraktionen eintritt, könnte nur äußerste Spuren von Eiweißstoffen anzeigen, deren Vorhandensein in alkoholischen Lösungen im allgemeinen ausgeschlossen erscheint.

Bei dieser Gelegenheit sei neuerdings darauf hingewiesen, daß die für den qualitativen Nachweis der Aminogruppen der α-Aminosäuren angegebene Ninhydrinreaktion für diesen Nachweis nicht geeignet erscheint, worauf zuerst *Neuberg*[1]) in einer den Gegenstand erschöpfend behandelnden Arbeit aufmerksam gemacht hat, in der er den Nachweis erbrachte, daß auch eine ganze Reihe anderer organischer Substanzen diese Reaktion gibt; vor *Neuberg* haben *Halle*, *Löwenstein* und *Pribram*[2]) gleichfalls gezeigt, daß das Triketohydrindenhydrat auch mit anderen Stoffen als mit α-Aminosäuren die charakteristische Farbenreaktion zeigt. Da sie aber im wasserfreien Medium bei Gegenwart von Lauge gearbeitet haben, so sind die unter normalen Bedingungen gewonnenen Feststellungen *Neubergs* für die Beurteilung der Ninhydrinreaktion als maßgebend und entscheidend anzusehen [vgl. hierzu auch *Epstein* und *Paul*[3])].

Für weitere Proben wurden die Abdunstungsrückstände von 5 ccm Extrakt *mit Wasser extrahiert*, die wässerige Flüssigkeit von trübenden Beimengungen durch Filtration befreit und im wässerigen Filtrat auf Phosphor und Schwefel geprüft. Das negative Resultat dieser Proben zeigt, daß der früher direkt in der Schmelze der Abdunstungsrückstände des Extraktes nachgewiesene *Schwefel* und *Phosphor* in den Extrakten in *organischer* Bindung vorhanden ist.

Da die relativ spärliche Ausbeute extrahierbarer Substanz und der Verbrauch bereits beträchtlicher Mengen der zur Verfügung stehenden Extrakte besondere Sparsamkeit erforderlich machten, so wurden

---

[1]) *Neuberg*, diese Zeitschr. **56**, 550, 1913; **67**, 56, 1914.
[2]) *Halle*, *Löwenstein* und *Pribram*, ebendaselbst **55**, 375, 1913.
[3]) *Epstein* und *Paul*. Zeitschr. f. physiol. Chem. **128**, 14ff., 1923.

die weiteren Untersuchungen unter Heranziehung der *Mikroanalyse* fortgesetzt.

Wir wandten uns an den Vorstand des medizinisch-chemischen Universitätsinstituts in Graz, Herrn Prof. Dr. *Fritz Pregl*, als den Altmeister der Mikroanalyse, welcher in entgegenkommendster Weise die Fortführung der Untersuchung in seinem Institut unter seiner und der Leitung *Hans Liebs* gestattete.

Die weiteren Untersuchungen strebten auf möglichst direktem Wege das Ziel der Isolierung der für den Gaucherstoffkomplex charakteristischen Substanzen an. *Lieb* schlug dabei folgenden Weg vor:

Zunächst wurden von den alkoholischen Extraktfraktionen von Gauchermilz und von Normalmilz mit verschiedenen wässerigen Salzlösungen von Schwermetallen Niederschläge gefällt und auf ihre Beschaffenheit angesehen, indem zu etwa 2 ccm Extraktfraktion je zwei bis drei Tropfen Metallsalzlösungen hinzugefügt wurden. Tabelle IV gibt hierüber Aufschluß.

Die in der *40°-Fraktion* der alkoholischen *Gaucher*milzextrakte sehr reichlich und rasch sich absetzenden, grobflockigen *gequollenen Niederschläge* unterscheiden sich von den spärlichen feinflockigen Niederschlägen der *Normalmilz*extrakte unter anderem dadurch, daß letztere *nicht quellen*. Ebenso sind auch die *Fällungsniederschläge* aus den *Siedefraktionen* sowohl von Gaucher- als auch Normalmilzextrakten *nicht quellend* (!).

Die eigenartige gequollene Beschaffenheit der Metallsalzniederschläge der 40°-Fraktion veranlaßte uns, die mit Quecksilberchlorid entstandenen Niederschläge dieser Fraktion einer Untersuchung zu unterziehen.

Die Versuchsanordnung war folgende:

Versuch 1.

Zu 10 ccm Extrakt (40°-Fraktion) wurden 3 ccm einer kaltgesättigten, wässerigen Quecksilberchloridlösung gefügt. Es entsteht sofort der reichliche, grobflockige, gequollene Niederschlag. Nach längerem Stehen wird scharf zentrifugiert, der überstehende Alkohol, aus dem mit Quecksilberchlorid nichts mehr ausfällt, abgegossen. Sodann wird der Niederschlag in 10 ccm eines etwa 70proz. Alkohols gründlich verteilt und neuerlich zentrifugiert. Der Waschalkohol wird abgegossen. Der Niederschlag wird nunmehr wieder in 70proz. Alkohol suspendiert und in die Suspension am Wasserbade Schwefelwasserstoff eingeleitet. Von dem rasch sich bildenden Quecksilbersulfidniederschlag wird die alkoholische Lösung heiß abfiltriert und der Filterrückstand mit siedendem Alkohol sorgfältig gewaschen. Das alkoholische Filtrat wird nunmehr am Wasserbade eingedampft. Der Verdampfungsrückstand ist in kaltem Alkohol kaum, in heißem leicht löslich.

Tabelle IV.

Angewandtes Reagens	Fraktion	Gauchermilz		Normalmilz	
		Beschaffenheit des Niederschlages	Menge	Beschaffenheit des Niederschlages	Menge
$AgNO_3$	40°-	mäßig reichlich, grobflockig, *gequollen* [1])	+	spärlich, feinflockig, *nicht* quellend [2])	±
	Siede-	spärlichst, feinflockig, *nicht* quellend (?)	fast 0	äußerste Spur	fast 0
Silbersulfat	40°-	sehr reichlich, rasch sich absetzend, *gequollen*	+++	reichlich, feinflockig, *nicht* quellend	++
	Siede-	reichlich, feinflockig, *nicht* quellend	++	mäßig reichlich, feinflockig, *nicht* quellend	+
Quecksilberchlorid, $HgCl_2$	40°-	sehr reichlich, grobflockig, rasch sich absetzend, *gequollen*	+++	in geringer Menge deutlich feinflockig	+
	Siede-	(Spur Opaleszenz)	fast 0	(Spur Opaleszenz)	fast 0
		eine Siedefraktion, die durch 14tägige Extraktion gewonnen worden war, ergab geringe Mengen eines deutlichen Niederschlages	+		
Millons Reagens	40°-	reichlich, grobflockig, *gequollen* [3])	++	mäßig reichlich, feinflockig, nicht quellend	+
	Siede-	mäßig reichlich, feinflockig, *nicht quellend*	+	kein Neiderschlag	0
Chlorcadmium	40°-	reichlich, locker gefügt, flockig, *gequollen.*	++	geringste Spur, feinflockig	fast 0
				nach längerem Stehen spärlicher Niederschlag	±
	Siede-	äußerste Spur, feinflockig, *nicht quellend*	fast 0	kein Niederschlag	0

[1]) Die Niederschläge sind gegen HNO_3 beständig.
[2]) Wie bei *Gaucher.*
[3]) Der Niederschlag rötet sich *nicht* beim Erwärmen, deutet also *nicht* auf das Vorhandensein von Eiweiß.

Aus der alkoholischen Lösung scheidet sich beim langsamen Abdunsten ein Niederschlag aus, der sich unter dem Polarisationsmikroskop größtenteils als kristallinisch erweist. Er ist in heißem Benzol, Aceton und Chloroform löslich, beim Erkalten scheidet sich die Substanz teils flockig, teils gelatinös ab.

Weiter wird eine Probe des Niederschlages nacheinander mit Äther, Aceton und Essigester kalt behandelt. In jedem dieser Lösungsmittel löst sich ein ganz geringer Teil der Substanz; der schließliche Rückstand wird in heißem Alkohol gelöst und die alkoholische Lösung eingeengt. Beim Erkalten scheidet sich *eine vollkommen farblose, größtenteils kristallinische, globulitenartig angeordnete Substanz aus, die in Wasser sehr stark quillt.*

Versuch 2.

Um die Menge der durch Quecksilberchlorid fällbaren Substanz zu bestimmen, werden 100 ccm Extrakt mit 30 ccm einer kaltgesättigten Quecksilberchloridlösung versetzt. Der ausgefällte Niederschlag wird weiter wie bei Versuch 1 behandelt.

In 100 ccm eines Extraktes mit dem Gehalt an gelösten Trockenpulverbestandteilen von 0,7596 g ergaben sich 0,2543 g der durch Quecksilberchlorid fällbaren Substanz, das sind 33,47 Proz. oder 8,53 g in 100 g getrockneter Gauchermilz (vgl. Tabelle V).

Der Körper wird in einer größeren Menge siedenden Alkohols gelöst, die Lösung mit Tierkohle behandelt und dann filtriert. Aus dem eingeengten Filtrat scheidet sich die Substanz beim Abkühlen als gelatinöse gequollene Masse vollkommen farblos aus, die sich im Mikroskop größtenteils kristallinisch erweist.

Sie zeigt einen ziemlich scharfen Schmelzpunkt von 176° C.

Bei der Untersuchung auf Phosphor und Stickstoff ergab sich, daß die Substanz *phosphorfrei* ist und 2 Proz. *Stickstoff enthält.*

Sie *reduziert* alkalische Kupfersalzlösung (*Haines*sches Reagens) direkt nicht, wohl aber nach Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure.

Die *a-Naphtholprobe* nach *Molisch* auf Kohlenhydrate fällt *positiv*, die *Cholesterinprobe* jedoch *negativ* aus, ebenso die *Pettenkofer*sche Reaktion mit Rohrzucker-Schwefelsäure. Dagegen gibt der Körper, mit konzentrierter Schwefelsäure verrieben, allmähliche Rotfärbung.

Der Extraktrückstand der 40°-Fraktion zeigt nach Hydrolyse mit *Haines*schem Reagens minimale Reduktion; in etwas wässerigem Alkohol aufgenommen, ergibt er eine positive *Molisch*sche Reaktion.

Da, wie aus dem bisher Gesagten hervorgeht, der quecksilberfällbare Körper in *Alkohol*, *Aceton*, *Benzol* und *Chloroform* in der Hitze *löslich*, im *kalten* und *heißen Äther unlöslich* ist, sich aus seinen alkoholischen Lösungen in der Kälte *kristallinisch* in Form von *Globuliten* abscheidet und durch einen *Schmelzpunkt von* 176° gekennzeichnet ist,

so erinnert er an das von *Kossel* und *Freitag* aus Hirnprotagon dargestellte *Cerebrin*[1]) und ist wohl nach der Einteilung *Fraenkels* zu den *Sphingogalaktosiden* zu rechnen.

Die 40°-Fraktionen des alkoholischen Extraktes aus *Normalmilz* wurden in der gleichen Weise wie die aus Gauchermilz verarbeitet. Die durch Quecksilber fällbare Substanz dieser Extrakte zeigte aber qualitativ und quantitativ ganz andere Eigenschaften als die des eben beschriebenen Körpers. Während sich unmittelbar nach Zusatz des Reagens zu der Fraktion der Gauchermilz ein grobflockiger, gequollener Niederschlag reichlich und rasch absetzt, treten, worauf bereits oben hingewiesen wurde, in der Fraktion der Normalmilz nur geringe Mengen eines deutlich feinflockigen, nicht quellenden Niederschlages auf. Der schließlich gereinigte restliche Niederschlag ist in kaltem Alkohol leicht löslich, auch bei weitgehender Einengung scheidet sich keine kristallinische Substanz aus. Der Niederschlag bildet nach Trocknen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure eine gelbbräunlich gefärbte, trockene Masse.

In 100 ccm eines Extraktes mit dem Gehalt an gelösten Trockenpulverbestandteilen von 0,450 g ergaben sich 0,0598 g durch Quecksilberchlorid fällbare Substanz, das sind 13,3 Proz. oder 1,35 g in 100 g getrockneter Normalmilz (vgl. Tabelle V). Nähere Untersuchungen über die Natur dieses Niederschlages sind noch ausständig.

Tabelle V.

	100 ccm Extrakt enthalten		Durch $HgCl_2$ fällbarer Körper	
	Abdunstungsrückstand	durch $HgCl_2$ fällbarer Körper	in Proz. auf Abdunstungsrückstand	in Proz. auf Trockenpulver
Normalmilz . .	0,450 g	0,0598 g	13,3	1,35
Gauchermilz .	0,7596 g	0,2543 g	33,47	8,53

Auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungen läßt sich *zusammenfassend* aussagen, daß der als *Gauchersubstanz* bezeichnete Komplex *keineswegs eine Einheit im chemischen Sinne* darstellt, sondern daß er *ein aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzter* Körper ist. Die nach erschöpfender Extraktion des Milzpulvers mit Alkohol und Äther unter Leitung *Siegmund Fränkels* in Wien zustande gekommenen Untersuchungen *Aiellos* deuten darauf hin, daß eine *Veränderung der Eiweißsubstanz* in der Gauchermilz eine Rolle spielt, die mit einer Stickstoffverarmung und Kohlenhydratzunahme einhergeht.

Unsere Untersuchungen der aus Milzpulver erhaltenen ätherischen und alkoholischen Extrakte zeigen, daß *integrierende Bestandteile des*

[1]) Vgl. Hoppe-Seylers Handb. d. pathol. u. physiol. chem. Analyse, bearbeitet von *H. Thierfelder*, S. 351. Berlin 1909.

als *Gauchersubstanz bezeichneten Komplexes* in den *Alkohol* übergehen[1]), während die *Ätherextrakte* von *Gauchermilz* gegenüber *Normalmilz* weder *qualitative noch quantitative Differenzen* aufweisen. Es erscheint somit unwahrscheinlich, daß ätherlösliche Phosphatide in größerer Menge an der Zusammensetzung des die Gauchersubstanz bildenden Komplexes beteiligt sind. Sehr wahrscheinlich scheint es hingegen, daß *der mit Quecksilberchlorid* aus dem alkoholischen Extrakt des Gauchermilzpulvers *ausfällbare, in Wasser quellbare,* phosphorfreie Körper, der anscheinend durch strenge eigentümliche, physikalische und chemische Eigenschaften charakterisiert und mit dem zu den *Sphingogalaktosiden* gehörigen *Cerebrin Kossels* und *Freytags* möglicherweise identisch ist, einen wichtigen *Bestandteil der Gauchersubstanz* bildet, um so mehr, als der quellbare Körper in den Extrakten der Normalmilz nicht nachweisbar ist. Seine Eigenschaft der Quellbarkeit könnte ganz gut das Aufschwellen der G. Z. zu den charakteristischen, abnorm großen Zellgebilden bedingen. Überdies dürften in Anbetracht der immerhin beträchtlichen Phosphorwerte auch nur in Alkohol lösliche Phosphatide an der Zusammensetzung des Komplexes beteiligt sein.

Zweifellos steht es also fest, daß der als Gauchersubstanz bezeichnete Zellinhalt eine keineswegs einheitliche, sondern sicher recht komplizierte Zusammensetzung besitzt, die sich wohl durch die omnivore phagozytische Tätigkeit der G. Z. leicht erklären läßt, wie sie auch histologisch nachgewiesen werden konnte. G. Z. speichern nicht nur verschiedenartige morphologische Elemente, sondern auch chemische Substanzen aller Art wahllos, es kann daher gar nicht wundernehmen, daß die verschiedenartigsten Schlackenbestandteile des Zellstoffwechsels in den G. Z. eingelagert werden, welche Bestandteile dann in den G. Z. zu sehr verschiedenartig zusammengesetzten Komplexen aufgebaut werden mögen, falls nicht schon durch den pathologischen Zellstoffwechsel vorgebildete Stoffkomplexe in fertigem Zustande den Zellen zugeführt würden. Es muß daher auch zugegeben werden, daß die eigenartige intraprotoplasmatisch abgelagerte Substanz in den G. Z. nicht in allen Fällen der *Gaucher*schen Krankheit durchaus einheitlich aufgebaut zu sein braucht.

---

[1]) Die Unlöslichkeit des als Gauchersubstanz bezeichneten Stoffkomplexes gegen siedenden Äther und Alkohol nach primärer Acetonextraktion im histochemischen Extraktionsversuche scheint, wie auch die sonstigen chemischen Extraktionen lehren, zu bestätigen, daß die alkohollöslichen Substanzen aus dem komplexen Inhalte der G. Z., in welchen die alkohollöslichen Stoffe mit alkoholunlöslichen innig gemengt sein dürften, nur in sehr lange währendem Extraktionsverfahren zur Lösung gebracht werden können, wenn nicht die Formalinfixation der Gewebe der Extraktion mit den genannten Solventien überdies noch Widerstand entgegensetzen würde.

Wenn nun abschließend ausgesagt werden kann, daß die im vorliegenden mitgeteilten Untersuchungen einiges Material bezüglich der Zusammensetzung des als Gauchersubstanz bezeichneten Stoffkomplexes gebracht haben, so bleibt doch noch manche Frage offen. Wir hoffen, auf diesem Wege bei Bearbeitung des weiteren einschlägigen Materials in absehbarer Zeit noch wesentliches zur Lösung des Problems beitragen zu können.

So wird der molekulare Aufbau der Quecksilber fällbaren Substanz, sowie die Zusammensetzung derjenigen Stoffe, die in der von diesem Körper abfiltrierten alkoholischen Flüssigkeit etwa noch enthalten sind, den Gegenstand weiter fortgesetzter chemischer Untersuchungen durch *Hans Lieb* bilden.

Hydrotropische Erscheinungen. II.

Von

R. Tamba.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie und Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 6. Januar 1924.)

Die Umwandlung unlöslicher oder wenig löslicher Substanzen in eine lösliche Form ist eine Aufgabe, die in gleichem Maße das Interesse der Chemiker, Physiologen und Pharmazeuten erregt. Durch synthetische Maßnahmen hat man auf verschiedenen Wegen die Erreichung des genannten Zieles angestrebt. Namentlich hat man versucht, durch Einführung neuer Gruppen den betreffenden Verbindungen eine gesteigerte Löslichkeit zu erteilen. Das am häufigsten eingeschlagene Verfahren besteht in der Anbringung von Carboxyl- oder Sulfosäureresten, die eine Bildung löslicher Salze ermöglichen, oder in der Anhängung von stark wasserlöslichen Radikalen, z. B. des Äthylenglykol- oder Glycerinrestes, die ihre Wasserlöslichkeit auf die angekoppelten Bestandteile mehr oder minder weitgehend übertragen.

Vorgänge ganz anderer Art liegen den hydrotropischen Erscheinungen zugrunde. Als *Hydrotropie* hat *Neuberg*[1]) die Fähigkeit bezeichnet, die wässerigen Lösungen zahlreicher Salze eigen ist und sie in den Stand setzt, in Wasser unlösliche Substanzen in wässerige Lösung zu bringen. Diese Erscheinung ist deshalb besonders merkwürdig, da im allgemeinen Salze die Eigenschaft haben, bei ihrer Auflösung im Wasser die Löslichkeit anderer darin vorhandener Stoffe herabzusetzen oder aufzuheben, wie es in den Aussalzungserscheinungen zutage tritt.

Für eine große Anzahl von Salzen hat *Neuberg* (l. c.) die Fähigkeit zur Hydrotropie festgestellt. Die von ihm früher untersuchten Verbindungen gehören hauptsächlich der aromatischen Reihe an. Es handelte sich um die Natrium- oder Kaliumsalze der Benzoesäure, der Carbolsäure, der

---

[1]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **76**, 107, 1916.

Hippursäure, der m-Nitrobenzoesäure, der p-Nitrobenzoesäure, der o-Aminobenzoesäure, der m-Aminobenzoesäure, der p-Aminobenzoesäure, der o-Jodbenzoesäure, der m-Chlorbenzoesäure, der p-Brombenzoesäure, der o-Oxybenzoesäure, der m-Oxybenzoesäure, der p-Oxybenzoesäure, der Anissäure, der m-Toluylsäure, der o-Kresotinsäure, der p-Kresotinsäure, der 3,5-Dijodsalicylsäure, der Benzolsulfinsäure, der Benzolsulfosäure, der p-Toluolsulfosäure, der α-Naphthoesäure, der β-Naphthoesäure, der α-Oxynaphthoesäure, der β-Oxynaphthoesäure, der α-Napthalinsulfosäure, der β-Naphthalinsulfosäure, der Naphthensäure, der Abietinsäure, der Sylvinsäure, der Thiophencarbonsäure, der Phenylessigsäure, der Phenylpropionsäure, der Zimtsäure, der Mandelsäure.

Außer den gewöhnlichen Alkalisalzen können auch die Ammonium- und Lithiumverbindungen verwendet werden. Das Lösungsvermögen, das die genannten Salze in wässeriger Lösung betätigen, wurde im wesentlichen untersucht gegenüber Alkoholen, Estern, Aldehyden, Ketonen, einfachen Basen, Alkaloiden sowie Proteinen. Es zeigte sich, daß Vertreter aller dieser Körperklassen, die in Wasser gar nicht oder schwer löslich sind, von den erwähnten Salzlösungen in wässerige Lösungen übergeführt werden. Auch bestimmte anorganische Salze, z. B. kohlensaurer Kalk und kohlensaure Magnesia sowie Magnesiumphosphat, ferner Fette, Lipoide, Harnsäure, ferner schließlich etliche Arzneimittel, wie Antifibrin, Anästhesin, Pyramidon, Veronal, Salipyrin, Sulfonal, konnten auf hydrotropischem Wege gelöst werden.

Angesichts der Vielseitigkeit der Erscheinungen und des Interesses, das sie beanspruchen, habe ich eine Reihe weiterer Salze auf ihre hydrotropische Kraft untersucht und berichte darüber im folgenden.

Zunächst prüfte ich bisher wenig untersuchte Salze von aliphatischem Herkommen, so von Isobuttersäure, n-Valeriansäure, n-Capronsäure, n-Heptylsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Oleinsäure, Trichloressigsäure; außerdem Copaivasäure und Abietinsäure. Die beiden letztgenannten hydroaromatischen Verbindungen habe ich insbesondere wegen ihres Vergleichs mit den Gallensäuren herangezogen. Diese besitzen, wie bekannt, die Fähigkeit, zahlreiche Stoffe zu lösen, und zwar ist es nach *H. Wieland* und *H. Sorge*[1]) besonders die Desoxycholsäure, die mit einer ganzen Reihe wasserlöslicher Stoffe kristallisierende Doppelverbindungen gibt, deren Alkalisalze wasserlöslich sind, eine Eigenschaft, die nach den Untersuchungen von *Fr. Boedecker*[2]) in noch stärkerem Maße der synthetisch gewonnenen Apocholsäure zukommt.

Die Resultate, die ich erzielt habe, gehen aus der nachfolgenden Übersicht hervor, die ich für jedes einzelne Salz gesondert gebe. Dabei habe ich mich darauf beschränkt, das Vermögen zur Auflösung im hydrotropischen Mittel an einzelnen typischen Körperklassen zu studieren.

---

[1]) *H. Wieland* und *H. Sorge*, H. **97**, 1, 1916.
[2]) *Fr. Boedecker*, Ber. **53**, 1852, 1920.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von isobuttersaurem Kalium.

(10 g in 20 ccm Wasser.)

1. a) 0,5 ccm Amylalkohol werden von 0,5 ccm Butyrat glatt gelöst. Bei Zugabe von 0,2 ccm Wasser bleibt die Flüssigkeit klar, nach Zugabe weiteren 0,1 ccm Wassers tritt Trübung ein, beim Erwärmen wird die Flüssigkeit jedoch wieder homogen.

b) 0,5 ccm Amylalkohol werden von 2,0 ccm Butyrat gelöst. Bei Zugabe von 0,3 ccm H_2O tritt schwache Trübung ein.

2. 0,5 ccm Chinolin lassen sich mit 2,0 ccm Butyrat nicht mischen.

3. 0,5 ccm Anilin sind mit 3,0 ccm Butyrat unmischbar.

4. 0,5 ccm Cyclohexanon und 3,0 ccm Butyrat sind unmischbar.

5. 0,5 ccm Benzylalkohol lösen sich in 1,5 ccm Butyrat beim Erwärmen, in der Kälte tritt Trübung ein.

6. 1,0 ccm HCl-Chininlösung (1proz.), mit 3,0 ccm isobuttersaurem Kalium gemischt, bleibt bei Zusatz von 0,1 ccm n/10 NaOH klar.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von n-valeriansaurem Kalium.

(10 g in 20 ccm Wasser.)

1. 1,0 ccm Amylalkohol löst sich leicht in 0,5 ccm Valerianat. Bei Zugabe von 0,5 ccm Wasser tritt Trübung ein, die Flüssigkeit wird bei Erwärmen aber wieder klar. 1,2 ccm Wasser verträgt die Lösung in der Hitze, bei Zugabe von 1,3 ccm Wasser jedoch tritt Sonderung in Schichten ein.

2. 1,0 ccm Benzylalkohol löst sich glatt in 0,5 ccm Valerianat. Schon 0,1 ccm Wasserzugabe trübt die Lösung stark in der Kälte, beim Erwärmen gehen jedoch alle Substanzen in Lösung. 0,7 ccm Wasser werden nicht mehr vertragen.

3. 1,0 ccm Benzaldehyd ist mit Valerianat in Zugaben von 0,5 bis 4,0 ccm unmischbar.

4. 1,0 ccm Cyclopentanol ist mit 0,5, 1,5, 2,5 ccm Valerianat mischbar, mit 3,0 ccm Valerianat tritt beim Erwärmen Sonderung in Schichten ein.

5. 0,1 ccm Nitrobenzol ist mit 5,0 ccm Valerianat nicht mischbar.

6. 0,5 ccm Anilin sind mit 3,0 ccm Valerianat unmischbar.

7. 1,0 ccm Chinolin wird von 0,5 ccm Valerianat glatt gelöst; 0,1 ccm H_2O gibt Trübung, beim Erwärmen Sonderung in Schichten.

8. 1,0 ccm Essigester ist mit 4,0 ccm Valerianat unmischbar.

9. 1,0 ccm der HCl-Chininlösung, mit 3,0 ccm Valerianat versetzt, bleibt auf Zugabe von 0,5 ccm n/10 NaOH klar.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von n-capronsaurem Kalium.

(10 g in 20 ccm Wasser.)

1. 1,0 ccm Amylalkohol löst sich leicht in 0,5 ccm Capronat. 0,1 ccm H_2O wird vertragen, 0,2 ccm H_2O geben Trübung; beim Anwärmen erfolgt Klärung, bei 0,9 ccm H_2O tritt Trennung in Schichten ein.

2. 1,0 ccm Benzylalkohol ist mit 2,0 ccm Capronat unmischbar.

3. 1,0 ccm Benzaldehyd ist mit 2,0 ccm Capronat unmischbar.
4. 1,0 ccm Cyclohexanon ist mit 2,0 ccm Capronat unmischbar.
5. 0,1 ccm Nitrobenzol ist mit 2,0 ccm Capronat unmischbar.
6. 0,1 ccm Anilin ist mit 2,0 ccm Capronat unmischbar.
7. 1,0 ccm Chinolin ergibt mit 0,5 ccm Capronat eine trübe Lösung, mit 2,0 ccm Capronat tritt beim Erwärmen Sonderung in Schichten ein.
8. 1,0 ccm Essigester ist mit 2,0 ccm Capronat unmischbar.
9. 1,0 ccm HCl-Chininlösung (1proz.), mit 3,0 ccm Capronat gemischt. bleibt auf Zusatz von 0,2 ccm n/10 NaOH klar.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von n-heptylsaurem Natrium.

(10 g in 20 ccm Wasser.)

1. 0,2 ccm Amylalkohol sind mit 0,1 ccm Heptylat mischbar und vertragen 0,4 ccm Wasserzugabe. Bei 0,5 ccm Wasser tritt Trübung ein, die beim Erwärmen verschwindet, bei 0,8 ccm Wasserzusatz erfolgt Sonderung in Schichten.
2. 0,2 ccm Benzylalkohol und 0,1 ccm Heptylat sind glatt mischbar und vertragen 0,1 ccm Wasser; bei 0,2 ccm Wasserzugabe starke Trübung; mit 0,4 ccm Wasser wird die Flüssigkeit trübe.
3. 0,2 ccm Benzaldehyd sind mit 0,6 ccm Heptylat unmischbar, mit 0,7 ccm Heptylat in der Hitze löslich und vertragen dann 0,2 ccm Wasser; bei 0,3 ccm Wasser Sonderung in Schichten.
4. 0,2 ccm Cyclohexanon sind mit 0,1 ccm Heptylat glatt mischbar bei gelindem Erwärmen, auf Zugabe von 0,1 ccm Wasser Trübung.
5. 0,05 ccm Nitrobenzol mit 1,1 ccm Heptylat unmischbar, mit 1,2 ccm fast gelöst beim Erwärmen, bei Zugabe von 1,5 ccm Wasser Trübung, beim Erwärmen klar, 2,0 ccm Wasser werden nicht mehr vertragen.
6. 0,2 ccm Chinolin sind mit 0,1 ccm Heptylat glatt mischbar; 0,1 ccm Wasser wird nicht vertragen.
7. 0,2 ccm Essigester sind mit 0,3 ccm Heptylat nicht mischbar, mit 0,4 ccm Heptylat glatte Lösung; 0,7 ccm Wasser werden vertragen.
8. 0,1 ccm 1proz. HCl-Chininlösung, mit 0,3 ccm Heptylat gemischt, bleibt bei Zusatz von 0,7 ccm n/10 NaOH klar.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von palmitinsaurem Natrium.

(5 g in 50 ccm Wasser.)

1. 0,2 ccm Amylalkohol sind mit 0,1 ccm palmitinsaurem Natrium glatt mischbar. Bei Zusatz von 0,1 ccm Wasser Trübung, bei gelindem Erwärmen klar, 0,2 ccm Wasser werden nicht mehr vertragen.
2. 0,2 ccm Benzylalkohol sind mit 0,1 ccm palmitinsaurem Natrium unmischbar, in 0,4 ccm glatt löslich; 0,1 ccm Wasser wird vertragen.
3. 0,2 ccm Benzaldehyd sind in 1,0 ccm palmitinsaurem Natrium unlöslich.
4. 0,2 ccm Cyclohexanon sind in 0,4 ccm palmitinsaurem Natrium unlöslich, in 0,5 ccm glatt löslich und vertragen 5,0 ccm Wasser.
5. 0,05 ccm Nitrobenzol sind in 1,0 ccm palmitinsaurem Natrium unlöslich, in 1,1 ccm löslich und vertragen 5,0 ccm Wasser, aber nur beim Erwärmen.

6. 0,2 ccm Anilin sind mit 1,0 ccm palmitinsaurem Natrium unmischbar, Sonderung in Schichten.

7. 0,2 ccm Chinolin sind mit 1,0 ccm palmitinsaurem Natrium unmischbar.

8. 1,0 ccm 1proz. HCl-Chininlösung, mit 0,3 ccm palmitinsaurem Natrium gemischt, bleibt bei Zusatz von 1,0 ccm n/10 Natronlauge klar.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von stearinsaurem Natrium.

(5 g in 50 ccm Wasser.)

1. 0,2 ccm Amylalkohol sind in 0,1 ccm stearinsaurem Natrium glatt löslich. 0,1 ccm Wasser wird vertragen, bei 0,2 ccm Wasser tritt Trübung und Sonderung in Schichten ein.

2. 0,2 ccm Benzylalkohol sind in 0,4 ccm stearinsaurem Natrium unmischbar, mit 0,5 ccm stearinsaurem Natrium klar mischbar und vertragen 0,1 ccm Wasser; 0,2 ccm Wasser werden nicht mehr vertragen.

3. 0,2 ccm Benzaldehyd sind mit 0,8 ccm stearinsaurem Natrium nicht mischbar.

4. 0,2 ccm Cyclohexanon sind mit 0,3 ccm stearinsaurem Natrium nicht mischbar.

5. 0,05 ccm Nitrobenzol lassen sich mit 0,8 ccm stearinsaurem Natrium nicht mischen.

6. 0,2 ccm Anilin lösen sich nicht in 0,3 ccm stearinsaurem Natrium, Sonderung in Schichten.

7. 0,2 ccm Chinolin sind mit 0,1 ccm stearinsaurem Natrium glatt löslich, bei 0,1 ccm Wasser starke Trübung und bald Sonderung in Schichten.

8. 0,1 ccm 1proz. HCl-Chininlösung, mit 0,3 ccm stearinsaurem Natrium vermischt, bleibt auf Zusatz von 1 ccm n/10 Natronlauge klar.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von oleinsaurem Kalium.

(10 g in 50 ccm Wasser.)

1. 0,2 ccm Amylalkohol sind mit 0,1 ccm oleinsaurem Kalium glatt mischbar, 0,3 ccm H_2O werden beim Erwärmen vertragen.

2. 0,2 ccm Benzylalkohol sind mit 0,2 ccm oleinsaurem Kalium beim Anwärmen mischbar.

3. 0,2 ccm Benzaldehyd sind mit oleinsaurem Kalium nicht mischbar.

4. a) 0,2 ccm Cyclohexanon sind in 0,1 ccm oleinsaurem Kalium glatt löslich. Eine Zugabe von Wasser wird in der Kälte nicht vertragen.

b) 0,2 ccm Cyclohexanon, mit 0,3 ccm oleinsaurem Kalium in Lösung gebracht, vertragen einen beliebigen Wasserzusatz.

5. 0,05 ccm Nitrobenzol, mit 0,9 ccm oleinsaurem Kalium vermischt, ergeben beim Erwärmen eine fast völlige Lösung und vertragen dann einen beliebigen Zusatz von Wasser.

6. 0,2 ccm Anilin sind mit 0,6 ccm oleinsaurem Kalium beim Erwärmen mischbar und vertragen 2,0 ccm Wasserzusatz.

7. 0,2 ccm Chinolin sind mit 0,6 ccm oleinsaurem Kalium unmischbar, mit 0,7 ccm oleinsaurem Kalium beim Erwärmen löslich und vertragen dann 3,0 ccm Wasser.

8. 0,1 ccm HCl-Chininlösung (1proz.), mit 0,3 ccm oleinsaurem Kalium gemischt, verträgt einen Zusatz von n/10 Natronlauge in beliebiger Menge.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von trichloressigsaurem Natrium.

(5 g in 10 ccm Wasser.)

1. 0,2 ccm Amylalkohol gehen mit 0,1 ccm trichloressigsaurem Natrium leicht in Lösung und vertragen 0,2 ccm Wasser.

2. a) 0,2 ccm Benzylalkohol sind in 0,1 ccm trichloressigsaurem Natrium löslich; 0,1 ccm Wasser ergeben zunächst Trübung, darauf Sonderung in Schichten.

b) 0,2 ccm Benzylalkohol, mit 0,3 ccm trichloressigsaurem Natrium vermischt, vertragen 0,2 ccm Wasser.

3. 0,2 ccm Benzaldehyd sind mit trichloressigsaurem Natrium nicht mischbar.

4. a) 0,2 ccm Cyclohexanon sind mit 0,1 ccm trichloressigsaurem Natrium glatt mischbar und vertragen keinen Zusatz von Wasser.

b) 0,2 ccm Cyclohexanon, mit 0,3 ccm trichloressigsaurem Natrium vermischt, vertragen 0,7 ccm H_2O.

5. 0,05 ccm Nitrobenzol sind mit trichloressigsaurem Natrium nicht löslich.

6. 0,2 ccm Anilin sind mit trichloressigsaurem Natrium unmischbar.

7. 0,2 ccm Chinolin sind mit trichloressigsaurem Natrium unmischbar.

8. 0,1 ccm 1proz. HCl-Chininlösung, mit 0,4 ccm trichloressigsaurem Natrium vermischt, verträgt eine beliebige Zugabe von n/10 Natronlauge.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von copaivasaurem Natrium.

(5 g in 10 ccm Wasser.)

1. 0,2 ccm Amylalkohol sind mit 0,1 ccm copaivasaurem Natrium glatt mischbar, 0,7 ccm Wasser werden vertragen.

2. 0,2 ccm Benzylalkohol sind mit copaivasaurem Natrium unmischbar.

3. 0,2 ccm Benzaldehyd sind mit 1,0 ccm copaivasaurem Natrium nicht mischbar.

4. 0,2 ccm Cyclohexanon sind mit 0,7 ccm copaivasaurem Natrium nicht mischbar; 0,8 ccm copaivasaures Natrium ergeben Lösung, die 3,0 ccm Wasser verträgt.

5. 0,05 ccm Nitrobenzol sind mit 0,2 ccm copaivasaurem Natrium nicht mischbar; mit 0,3 ccm copaivasaurem Natrium gehen sie in Lösung, 0,2 ccm Wasser werden alsdann vertragen.

6. 0,2 ccm Anilin gehen mit 1,0 ccm copaivasaurem Natrium gut in Lösung und vertragen eine beliebige Wasserzugabe.

7. 0,2 ccm Chinolin sind mit 1,0 ccm copaivasaurem Natrium nicht mischbar.

8. 0,1 ccm 1proz. HCl-Chininlösung, mit 0,3 ccm copaivasaurem Natrium vermischt, verträgt einen Zusatz von 1,0 ccm n/10 Natronlauge.

Hydrotropische Wirkungen der wässerigen Lösung von abietinsaurem Natrium.

(10 g in 30 ccm Wasser.)

1. 0,2 ccm Amylalkohol lassen sich mit 0,1 ccm abietinsaurem Natrium lösen und vertragen 0,3 ccm Wasser.
2. 0,2 ccm Benzylalkohol sind in 0,7 ccm abietinsaurem Natrium löslich und vertragen 2,5 ccm H_2O.
3. 0,2 ccm Benzaldehyd lassen sich mit 0,9 ccm abietinsaurem Natrium mischen und vertragen 0,4 ccm H_2O.
4. 0,2 ccm Cyclohexanon sind mit 0,3 ccm abietinsaurem Natrium klar mischbar und vertragen 0,2 ccm Wasser.
5. 0,05 ccm Nitrobenzol gehen mit 0,8 ccm abietinsaurem Natrium glatt in Lösung und vertragen 1,0 ccm H_2O.
6. 0,2 ccm Anilin lassen sich mit 0,4 ccm abietinsaurem Natrium glatt lösen und vertragen 0,4 ccm Wasser.
7. 0,2 ccm Chinolin sind mit 0,8 ccm abietinsaurem Natrium klar mischbar und vertragen 2,0 ccm Wasser.
8. 0,1 ccm 1proz. HCl-Chininlösung bleibt nach Zumischung von 0,3 ccm abietinsaurem Natrium auf Zusatz von 1,0 ccm n/10 NaOH klar.
9. 0,4 ccm copaivasaures Natrium (50proz.) können 0,5 g Cholesterin vollständig auflösen und vertragen 0,5 ccm H_2O.
10. 0,6 ccm abietinsaures Natrium (10 g in 30 ccm H_2O) können 0,05 g Cholesterin vollständig auflösen; eine Zugabe von 0,9 ccm Wasser wird vertragen.

Darstellung von Acetessigsäurelösungen.

Von

Gustaf Ljunggren.

(Medizinisch-chemisches Institut Lund.)

(Eingegangen am 7. Januar 1924.)

Über Acetessigsäure, ihr Verhalten inner- und außerhalb des Organismus sind eine große Anzahl Experimentaluntersuchungen ausgeführt worden. Anlaß hierzu war ihre hervorragende physiologische Bedeutung, nicht nur auf Grund ihres Zusammenhanges mit den Acetonkörpern bei Diabetes, sondern auch der großen Rolle halber, die sie als Zwischenprodukt beim Stoffwechsel spielt. Zu diesen Versuchen bereitete man Lösungen des Natriumsalzes, welches im Gegensatz zur freien Säure in der Kälte besser haltbar ist. Die Methoden, deren man sich bedient hat, um aus dem Acetessigester durch Hydrolyse das Natriumsalz zu erhalten, sind indessen oft kompliziert und verlustbringend.

Die Acetessigsäure wurde zuerst von *Ceresole* (1) dargestellt und isoliert. Seine Methode wurde dann mit nur geringen Abänderungen zur Darstellung von Acetessigsäurelösungen verwendet. So gibt *Neuberg* (2) an: „13 ccm reiner Acetessigester werden mit 485 ccm Wasser übergossen und mit 15 ccm konzentrierter Natronlauge ($D = 1,34$) versetzt. Beim Umschütteln erfolgt alsbald homogene Mischung. Nach 24stündigem Stehen sättigt man mit Kohlendioxyd, schüttelt die alkalische Lösung mehrfach in einem Scheidetrichter mit Äther aus, der unverseiften Acetessigester aufnimmt. Nach dem Abheben der Ätherschicht neutralisiert man die alkalische Flüssigkeit genau mit verdünnter Schwefelsäure. Diese Lösung von acetessigsaurem Natrium kann zu allen Reaktionen der Säure dienen". *Hurtley* (3) läßt die alkalische Hydrolysemischung 44,5 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. *Engfeldt* (4) läßt die Hydrolysemischung 24 Stunden bei 37° stehen, ist jedoch der Ansicht, daß die Verseifung auch dann nicht vollendet ist, und daß man auf Grund gleichzeitig erfolgender Acetonspaltung keine längeren Zeiten verwenden dürfe. Bei der Entfernung von unverbrauchtem Ester muß man auf Verunreinigungen, die sich am besten im Handel erhältlichen Äther befinden, Rücksicht nehmen. Schließlich muß die Lösung bei 37° mit Tierkohle entfärbt werden. Durch eine geeignete Vakuumbehandlung und Durchlüftung bei etwa 30° läßt sich aller Äther und der größte Teil des bei der Bereitung gebildeten Alkohols und Acetons entfernen.

Nach dieser Behandlung wird die Lösung mit Salzsäure in geringem Überschuß neutralisiert, aufs neue mit einem Vakuumluftstrom behandelt und schließlich mit Natronlauge bis zu einer schwachen Rosafärbung (Rosolsäure) versetzt. Dann wurde die Lösung auf die gewünschte Stärke verdünnt und der Gehalt nach *Messinger* bestimmt. *Schaeffer* (5) stellt sich eine reine Lösung her, indem er nach vollendeter Hydrolyse und dem Entfernen eventuell unverbrauchten Esters mit Äther ansäuert, die Säure darauf mit Äther extrahiert und dann die Ätherlösung mit Alkali schüttelt.

Diese langen Zeiten zur Hydrolyse scheinen überflüssig zu sein und bringen unerwünschte Komplikationen mit sich, worauf zuerst *Widmark* (6) aufmerksam machte. *Goldschmidt* und Mitarbeiter (7) haben nämlich die Hydrolyse des Acetessigesters eingehend studiert und gezeigt, daß sie eine monomolekulare Reaktion ist. Sie bestimmten auch die Geschwindigkeitskoeffizienten. Aus den Werten für dieselben ergibt sich, daß der Acetessigsäureäthylester bei 25^0 ($k = 0{,}0080$ Brigg. log.) nach 38 Minuten zur Hälfte verseift ist und daß nach 6 Stunden und 15 Minuten von der ursprünglichen Estermenge nur mehr 1 Prom. übrigbleibt, ein Wert, von dem es mehr als zweifelhaft ist, ob man durch einfaches Ausschütteln mit Äther in alkalischer Lösung überhaupt mehr erreichen kann. Für den Methylester (8) sind die entsprechenden Werte 25 Minuten, sowie 4 Stunden 10 Minuten, also noch kürzere Zeiten. Daraus, daß die Reaktion monomolekular ist, folgt, daß die Geschwindigkeit, wenigstens innerhalb gewisser Grenzen, von der Konzentration unabhängig ist, was indessen wahrscheinlich bei *sehr starken* Lösungen, für welche die Gesetze verdünnter Lösungen keine Gültigkeit mehr haben, nicht der Fall ist.

Ein Nachteil der langen Hydrolysezeit ist, daß die gebildete Acetessigsäure während dieser Zeit eine Ketonspaltung erfährt. Die Kinetik derselben wurde von *Widmark* (6) (9) bestimmt. Die Reaktion ist in alkalischer Lösung monomolekular ($k = 0{,}00002$ nat. log., 25^0). Während einer Hydrolysezeit von 4 Stunden werden also ungefähr 0,3 Proz. unter Bildung von Aceton und Kohlensäure gespalten.

Handelt es sich um genaue Versuche, so muß man darauf Rücksicht nehmen, daß das Handelsprodukt nicht rein ist. Wie schon *Ceresole* gezeigt hat, enthält der Acetessigester immer etwas Dehydracetsäure, die indessen leicht durch Ausschütteln mit Pottasche entfernt werden kann. *Elion* (10) zeigte, daß er bis zu 4 Proz. Verunreinigungen enthält, wahrscheinlich höhere Homologen des Esters, welche durch fraktionierte Destillation nicht entfernt werden können. Ein vollständig reines Produkt erhält man durch die Überführung desselben in seine Bisulfitverbindung. Der Methylester wird, wie ich gezeigt habe (8), mit Vorteil auf die gleiche Weise gereinigt. Dieser Ester ist allerdings teurer, er hat jedoch vor der Äthylverbindung den Vorteil, daß er rascher hydrolysiert wird, also unter geringerer Spaltung. Auch

wirkt der hierbei gebildete Methylalkohol auf eventuell darauf folgende Acetonbestimmungen nicht störend ein, oder er kann auch, wenn notwendig, seiner größeren Flüchtigkeit halber leichter als der Äthylalkohol entfernt werden. Doch ist die störende Einwirkung von Äthylalkohol bei der Acetonbestimmung oft übertrieben.

Da diese Esterhydrolyse monomolekular ist, ist auch die Geschwindigkeit einem erhöhten Zusatz von Alkali nicht proportional, weshalb man einen unnötigen Überschuß desselben, der später neutralisiert werden müßte, nicht zu verwenden braucht. *Widmark* (6) stellte fest, daß bei der Hydrolyse immer einige Prozent mehr Alkali als theoretisch berechnet, verbraucht wird. Dies habe auch ich beobachtet, es trifft indessen nicht zu, wenn man von gereinigtem Ester ausgeht sowie Jenaglasgefäße anwendet, welche nach *Ostwald* (11) mit Wasserdampf ausgedämpft und mit kohlensäurefreier Luft durchgeblasen wurden.

Ein Alkaliüberschuß von einigen wenigen Prozenten ist jedoch zu empfehlen, so daß man sicher sein kann, daß die Reaktion vollständig verläuft. Fügt man den Ester zu einer vorher abgemessenen Menge Alkali hinzu, so kann man, wie der folgende Versuch zeigt, mit dem Volumen als Addent rechnen. Das spezifische Gewicht einer 0,0945 n Natronlauge wurde bei 18° zu 1,002 bestimmt. Hierauf wurden 1,0546 g Ester, spezifisches Gewicht (8) $D_4^{20} = 1{,}0762$, einem Volumen von 0,980 ccm entsprechend abgewogen und in einem Kolben mit 100,40 ccm der Lauge versetzt. Das spezifische Gewicht der Mischung wurde zu 1,0025 bestimmt, berechnet 1,0023.

Nach Schluß der Hydrolyse wird der Alkaliüberschuß mit Salzsäure neutralisiert oder, wenn die Lösung für Injektionen verwendet werden soll, indem man während 10 Minuten Kohlensäure durchbläst. Die Lösung enthält dann als Verunreinigungen nur bei der Neutralisation gebildete Chloride oder Carbonate, deren Mengen jedoch minimal gemacht werden können, sowie unbedeutende Spuren von Aceton, entsprechende Mengen Carbonat und Methylalkohol. Ist es für die Versuche, zu denen die Lösung verwendet werden soll, nötig, daß dieser entfernt wird, so geschieht dies am einfachsten durch Austreiben mittels eines Luftstromes im Vakuum. Hierbei ist zu beachten, daß der Luftstrom zuerst gewaschen werden soll, was am besten mit alkalischer Jodlösung geschieht, daß sich die Lösung selbst in einem Wasserthermostaten befindet, um eine Abkühlung während der Verdunstung zu verhindern, und daß der Methylalkohol in einer mit konzentrierter Schwefelsäure beschickten Waschflasche, zu der nur ein kurzes Rohr führt, absorbiert wird. Je größere Kapazität die Luftpumpe besitzt, einen desto kräftigeren Luftstrom kann man, ohne den Druck zu erhöhen, durch die Lösung leiten. Anstatt der gewöhnlichen Wasser-

strahlpumpen, welche zu schwach sind, habe ich eine Gaedepumpe verwendet. Hierbei wird, um die Pumpe zu schützen, zwischen dieser und der Waschflasche ein mit Kali und Natronkalk beschickter Trockenturm eingeschaltet. Wie lange die Destillation zu dauern hat, ist vom Apparat, dem Druck und der Temperatur abhängig und muß durch einen Vorversuch ermittelt werden. Als Vergleich kann angeführt werden, daß aus 10 ccm 5proz. Methylalkohols bei 25° und 5 mm Hg dieser in 12 Minuten, praktisch genommen, vollständig entfernt wurde.

Hinsichtlich der Haltbarkeit einer Natriumacetoacetatlösung sei folgendes angeführt: Der Koeffizient für die Ketonspaltungsgeschwindigkeit derselben beträgt bei 37° 0,00008 (nat. log.) und bei 25° 0,00002. Hieraus berechnet sich der Temperaturkoeffizient nach der Formel:

$$\frac{K_1}{K_2} = \tau^{\frac{t_1-t_2}{10}} \quad \text{oder} \quad \log K_1 - \log K_2 = \frac{t_1 - t_2}{10} \log \tau; \quad \tau = 3{,}2.$$

Der Geschwindigkeitskoeffizient bei 0°, der auf Grund der langsamen Reaktion schwer bestimmt werden kann, läßt sich aus diesem Werte zu $k = 0{,}000001$ herleiten, und berechnet man aus der Formel für die monomolekulare Reaktion die Spaltung während 24 Stunden, so erhält man als Resultat 0,15 Proz.

Eine reine und definierbare Lösung von Natriumacetoacetat wird nach obigem am einfachsten dargestellt, indem man in einem mit kohlensäurefreier Luft ausgeblasenen Jenakolben eine mit etwa 2 Proz. Überschuß berechnete Menge Natronlauge auf 25° vorwärmt, sowie dann, am besten mit einer ausgewogenen Pipette, den Acetessigsäuremethylester zusetzt. Nach 4 Stunden und 10 Minuten ist die Hydrolyse beendet und die Lösung wird mit Salzsäure oder Kohlensäure neutralisiert. Die so erhaltene Lösung ist um 0,3 Proz. schwächer als theoretisch berechnet. Gebildeter Methylakolhol kann durch Durchblasen von reiner Luft im Vakuum entfernt werden. Wird Acetessigsäureäthylester benutzt, ist die Hydrolyse nach 6 Stunden und 15 Minuten vollzogen. Bei Aufbewahrung über Eis zerfallen pro Tag 0,15 Proz.

Literatur.

1) B. 15, 1327, 1871, 1882. — 2) Der Harn, S. 131. Berlin 1911. — 3) The Lancet, 26, april 1913. — 4) Diss. Lund, S. 42, 1920. — 5) Journ. of biol. Chem. 47, 435, 1921. — 6) Acta med. scand. 53, 396, 1920. — 7) *H. Goldschmidt* und *L. Oslan*, B. 31, 3390, 1900; 33, 1140, 1900; *H. Goldschmidt* und *V. Scholz*, B. 40, 6292, 1907. — 8) Vgl. *Ljunggren*, B. 66, 2469, 1923. — 9) Skand. Arch. f. Physiol. 42, 46, 1922. — 10) Rec. d. trav. chim. des Pays Bas. 3, 245. — 11) *Ostwald-Lutter*, Phys.-chem. Messungen, 3. Aufl., S. 469.

Über
eine neue kolorimetrische Mikro-Phosphorsäurebestimmung.

Von

Y. Terada (aus Nagoya).

(Aus dem Institut für animalische Physiologie, Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 7. Januar 1924.)

Zur Bestimmung sehr kleiner Phosphorsäuremengen sind heute im wesentlichen zwei Verfahren im Gebrauch, nämlich die von *Kleinmann*[1]) angegebene nephelometrische und die von *Embden*[2]) auf Grund der Arbeiten von *Pouget-Chouchok*[3]) und *Kleinmann* ausgearbeitete gravimetrische Methode. Bei der außerordentlichen Bedeutung, welche die Phosphorsäurebestimmung heute in der Physiologie und Klinik hat, lag es nahe, zu versuchen, eine den genannten Methoden gleichartige auszuarbeiten, welche ohne viel Zeitaufwand und mit einfachen Mitteln auch dem weniger geübten Analytiker zugänglich wäre.

Besonders geeignet würde ein Verfahren sein, das die einfachste Art der quantitativen Erfassung eines Stoffes, nämlich die kolorimetrische nutzbar macht. Dies kann aber bei der *Phosphorsäure* nur indirekt geschehen, indem man sie durch Molybdänsäure selbst oder durch *Molybdänstrychnin* nach dem Vorgehen von *Kleinmann* und *Embden* ausfällt, die frei gemachte Molybdänsäure durch eine Farbenreaktion sichtbar macht und nach Kolorimetrierung auf die anfängliche Phosphorsäuremenge berechnet. Von den vielen bekannten Farbenreaktionen des Molybdäns hat sich bei meinen Versuchen am brauchbarsten die von *Spiegel* und *Maas*[4]) angegebene weinrote Färbung erwiesen, welche bei Reduktion der Molybdänsäure durch *Phenylhydrazin* (Chlorhydrat) in essigsaurer Lösung auftritt.

Versuche, die Phosphorsäure im Molybdänkomplex durch kolorimetrische Bestimmung zu analysieren, sind in den letzten Jahrzehnten wiederholt gemacht worden. Eine ausführliche Übersicht über dieselben gibt *H. Kleinmann*, der sich eingehend mit der Kolorimetrie des Molybdänrots und

[1]) Diese Zeitschr. **99**, 19, 1919.
[2]) Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. I, Teil 3, Heft 5, 1921.
[3]) Bull. soc. chim. **4**, 164, 1909; 649, 1911.
[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **36**, 512, 1903.

Molybdänblaus befaßt hat. Er kommt zu dem Resultat, daß im wesentlichen nur die Färbung, welche Molybdän mit Ferrocyankalium gibt, eine gute Grundlage für die Bestimmung der Phosphorsäure bildet. Mengen unter 0,1 mg sind aber nicht mit dieser Methode zu fassen. Die Fehlergrenze beträgt 0,6 Proz. Von ausländischen Autoren haben sich in der neuesten Zeit hauptsächlich *Bell-Doisy*[1]) und *Denigès*[2]) um einfache, brauchbare, kolorimetrische P-Bestimmungsmethoden bemüht. Sie verzichten aber auf die Verwendung des Molybdänstrychninreagens. Die erst nach Abschluß der vorliegenden Untersuchungen uns zu Gesicht gekommene Arbeit von *Tisdall*[3]), welcher Molybdän mit Ferrocyankalium reduziert, benutzt zwar das Molybdänstrychnin, die Fehlergrenze aber ist etwa 5 Proz. Die vorliegende Methode hilft nun insofern einem gewissen Mangel ab, als sie trotz aller Einfachheit den Vergleich mit den besten bisher gebräuchlichen Verfahren in bezug auf Empfindlichkeit und Genauigkeit auszuhalten vermag.

Erforderliche Reagenzien.

1. Molybdän-Strychninlösung. 3 g Ammoniummolybdat werden in 20 ccm Wasser heiß gelöst. Ebenso löst man 0,15 g Strychninnitrat (strychnin. nitric. puriss. Merck) in 20 ccm heißem Wasser auf. Dann bringt man beide Lösungen in einen 100-ccm-Meßkolben und füllt mit 25proz. Salpetersäurelösung auf 100 ccm auf. Die Aufbewahrung der Lösung erfolgt in brauner Flasche. Die Lösung muß vor dem Gebrauch mit einem aschefreien Filter filtriert werden. Das Strychninnitrat soll brucinfrei sein.

2. 5proz. Salpetersäure.

3. 10proz. Natriumcarbonatlösung.

4. Phenylhydrazinlösung. 2 g Phenylhydrazinchlorhydrat + 0,5 g Oxalsäure werden in 100 ccm 30proz. Essigsäure gelöst; die Lösung wird filtriert und in brauner Flasche aufbewahrt.

5. Stammlösung von Ammoniumphosphormolybdat. 0,265 g von reinem trockenen phosphormolybdänsauren Ammonium werden in 5proz. Natriumcarbonatlösung ad 200 ccm gelöst. Der Gehalt dieser Lösung an P_2O_5 beträgt dann 3,784 Proz.

6. Farbenstandardlösungen. Zu 10 ccm Phenylhydrazinchlorhydratlösung werden verschiedene Mengen phosphormolybdänsaures Ammonium gegeben, und zwar entsprechen nach Tabelle I:

Tabelle I.

Standard	Ammoniumphosphormolybdatlösung (Nr. 5) in ccm	P_2O_5 in mg
A	6	0,3
B	4	0,2
C	2	0,1
D	1,2	0,06

Die bei der Reaktion auftretende weinrote Farbe kann bei Aufbewahrung in dunkler Flasche noch nach 5 bis 8 Tagen zum Kolorimetrieren benutzt werden. Im direkten Sonnenschein verändert sie sich bereits nach 30 Minuten,

[1]) Journ. of biol. Chem. **44**, 55, 1920.

[2]) C. r. des séances de la soc. de Biol. **84**, 875, 1921.

[3]) Journ. of biol. Chem. **50**, 329, 1922.

indem schließlich ein dunkelbräunlicher Farbenton auftritt. In diffusem Licht kommen zuerst nach 3 Stunden geringe Farbenänderungen zustande, so daß man zweckmäßig innerhalb zweier Stunden das Kolorimetrieren beendet hat.

Ausführung der Bestimmung.

4 bis 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit werden in ein Zentrifugenglas von 14 bis 15 ccm Inhalt gegeben und mit 5 ccm Strychninmolybdänreagens (Nr. 1) versetzt. Man schüttelt einigemal tüchtig durch und zentrifugiert nach einer Stunde (eventuell auch erst nach zwei Stunden) bis zum völligen Absetzen des Niederschlages ab. Der Niederschlag wird dreimal mit 5 ccm 5proz. Salpetersäure unter Umrühren mit einem dünnen Glasstäbchen gewaschen und jedesmal hinterher abzentrifugiert. Danach wird er mit 1 bis 2 ccm 10proz. Natriumcarbonatlösung unter leichtem Erwärmen gelöst. Eventuell noch vorhandene Rückstände lösen sich später auf dem Wasserbade.

Dieser Lösung setzt man — alles in dem *gleichen Zentrifugenglas* — 10 ccm Phenylhydrazinlösung zu und erwärmt das ganze 30 Minuten auf dem Wasserbade bei 70 bis 80°. Die entstandene weinrote Farblösung wird sodann quantitativ in einen Meßkolben von 100 ccm übergeführt und mit destilliertem Wasser auf 100 aufgefüllt. Hierauf wird eine Probe der Lösung im Reagenzglas mit den verschiedenen auf Vorrat gehaltenen Standardlösungen oberflächlich verglichen und zwischen zwei derselben eingepaßt. Der kolorimetrische Vergleich mit Hilfe des *Duboscq*eschen Kolorimeters (mit *Lummer-Brodhuhn*schem Prisma) geschieht gegen die passendste Standardlösung, welche am besten frisch bereitet und innerhalb zweier Stunden benutzt wird. Liegt der Farbwert in der Mitte zweier Standardlösungen, so findet der Vergleich zweckmäßigerweise gegen beide statt.

Beim Kolorimetrieren stellt man die Schichtdicke der Standardlösung (D_{st}) möglichst auf Skalenteil 80, mindestens aber über 50 ein, da sich auf diese Weise die Eigenfarbe der Phenylhydrazinchlorhydratlösung völlig verdecken läßt.

Berechnung: Bezeichnet man den Standardwert der benutzten Vergleichslösung (6) mit w, die Schichtdicke der zu prüfenden Lösung mit D_u, so ist ihr Gehalt an $P_2O_5 = \frac{D_{st} \cdot w}{D_u}$. Der Gehalt an H_3PO_4 ergibt sich durch Multiplikation mit 1,38.

Kritik der Methode.

1. Die Änderung der Farbtiefe ist proportional der Konzentration des P_2O_5-Gehaltes.

2. In einer Phosphatlösung von einem P_2O_5-Gehalt zwischen 0,3 und 0,06 mg ist eine genaue quantitative Bestimmung des P_2O_5 möglich. Die Fehlergrenze ist durch diejenige des Kolorimetrierens gegeben und beträgt ungefähr 0,5 Proz. (Tabelle II).

Tabelle II.

P_2O_5-Gehalt in mg	Schichtdicke in mm		Bestimmungsfehler in Proz.
	Standardlösung	Phosphatlösung	
0,3	80 (A) 60 (B)	80	0
		79,75	0,3
		40	0
0,15	90 (C)	60	0
		59,75	0,4
		59,9	0,2
0,1	80 (C)	79,75	0,3
		80	0
		79,9	0,1
0,09	80 (C)	88,75	0
		88,9	0,11
		88,9	
0,08	60 (C)	75,25	0,33
		75,1	0
		75,25	0,33
0,07	70 (D)	60,1	0,17
		60,25	0,4
		60,0	0
0,06	80 (D)	79,75	0,3
		79,9	0,1
		80	0

Ist eine höhere Konzentration zu erwarten, so ist die Lösung vorher zu verdünnen. Bei sehr verdünnten Phosphatlösungen kann durch entsprechende Einengung ebenfalls noch eine genaue Bestimmung ermöglicht werden.

KH_2PO_4 wurde dreimal umkristallisiert und im Trockenschrank bei 110° gut getrocknet. Davon wurden 0,9583 g geglüht bis zur Gewichtskonstanz. Bei zweimaliger Wägung wurden 0,8314 und 0,8316 g gefunden. Bei völlig reinen Präparaten beträgt der Wert nach *Treadwell*[1]) 0,8315 g. Mit Hilfe dieses reinen Präparates wurden nun Phosphatlösungen von verschiedener Konzentration hergestellt und diese mit der entsprechenden Standardlösung kolorimetrisch verglichen. Auf diese Weise konnte der Fehler der Mikrobestimmung ermittelt werden.

3. Die Phosphorsäurebestimmung im Harn mittels Makromethode ergibt mit der vorliegenden Mikromethode gute Übereinstimmung (s. Tabelle III).

Tabelle III. Phosphorsäurebestimmungen im Harn.

P_2O_5-Menge (mg) in 50 ccm unverdünntem Harn	
Makromethode (50 ccm)	Mikromethode (0,17 ccm)
—	68,46
69	68,58
—	68,46

[1]) *Treadwell*, Lehrb. d. analyt. Chem. 2, 625, 1922

Mit der Uranmethode wurden im Harn 69 mg P_2O_5 in 50 ccm gefunden. Als Indikator wurde Cochenille benutzt. Für die Mikrobestimmung wurde der Harn auf das 30fache verdünnt, und es gelangen 5 ccm davon zur Analyse. Die gefundene P_2O_5-Menge wurde auf 50 ccm unverdünnten Harns umgerechnet und das Resultat mit dem der Makromethode verglichen.

4. Die Phosphorsäurebestimmung im Froschmuskel stimmt mit den Resultaten, wie sie durch die *Embden*sche gravimetrische Methode erhalten werden, gut überein. Unsere Methode braucht aber weniger Zeit, erfordert weniger Ausgangsmaterial und ist erheblich billiger (s. Tabelle IV).

Tabelle IV.

Phosphorsäurebestimmung im Froschmuskel bei Ran. esculenta.

Nr.	Benutzte Muskelmenge g	Gefundene H_3PO_4-Menge i. Proz.	
		kolorimetrisch	gravimetrisch
1a	0,7993	0,3142	0,3212
1b	0,8548	0,3173	0,3152
2[1])	1,5851	0,3214	0,3258

10 ccm Schenckfiltrat wurden auf 100 ccm aufgefüllt, davon wurden 50 ccm für die gravimetrische, 10 ccm für die kolorimetrische Bestimmung benutzt.

Herrn Prof. *Bethe* möchte ich auch an dieser Stelle danken für das Interesse, das er stets meiner Arbeit entgegengebracht hat.

[1]) Bei Versuch 2 wurden vom Schenckfiltrat für die gravimetrische Bestimmung 12 ccm, für die kolorimetrische 1 ccm genommen.

Bemerkungen zur Wirkungsweise des Quecksilbers.

Von

Wolfgang Heubner (Göttingen).

(Eingegangen am 8. Januar 1924.)

Seit den bekannten Arbeiten von *Kroenig* und *Paul*[1]) gilt es bei zahlreichen Forschern und Lehrern als Axiom, daß das eigentlich wirksame Prinzip der Quecksilberverbindungen ausschließlich die Quecksilberionen seien, mindestens bei der desinfizierenden Wirkung[2]). Gewiß wird dies Axiom durch zahlreiche Befunde gestützt. Gewöhnlich wird aber nicht beachtet, daß mindestens ein *Teil* dieser Befunde gedeutet werden kann, ohne daß man das Quecksilberion als das wesentlichste Agens ansieht, und nur selten wird Rücksicht darauf genommen, daß verschiedene Tatsachen zu dem Axiom nicht ganz stimmen und wenigstens *ergänzende* Annahmen nötig machen.

Die wichtigste dieser Tatsachen ist die *geringere* Wirksamkeit des stärker dissoziierten Quecksilbernitrats (und -sulfats) gegenüber dem schwächer dissozierten Chlorid. Wie *Hailer*[3]) mit Recht ausführt, kann dies erklärt werden durch die partiell kolloide Natur und die dadurch bedingte stärkere Adsorbierbarkeit, vor allem aber durch eine bessere *Löslichkeit* des Sublimat*moleküls* in Eiweiß und Lipoiden, kurz in einer besseren Aufnahmefähigkeit ins *Innere* der Zellen; er meint, daß die Wirkung des Sublimats auf die Zellvermehrung „danach vorwiegend dem undissoziierten Molekül zukäme.“ Ich glaube, man könnte auf Grund *dieses* Materials auch mit einer Analogie zum Ammoniak und zur Essigsäure auskommen, die im Vergleich zu den stark dissoziierten Basen und Säuren leichter als nicht dissoziiertes *Molekül* eindringen, im Innern aber dann die wirksamen Ionen bilden, die selbst nicht permeabel sind.

Trotzdem scheint mir die alleinige Betrachtung der Quecksilber*ionen* die Komplikation der gegebenen Reaktionsmöglichkeiten zu verkennen. Offenbar muß man sich doch bei Annahme des genannten

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **21**, 414, 1896; Zeitschr. f. Hygiene **25**, 1, 1897.

[2]) Als Beispiele aus neuerer Zeit vgl. *Joachimoglu*, diese Zeitschr. **121**, 259, 1921; *Schoeller* und *Heck*, ebendaselbst **140**, 28, 1923.

[3]) *Die Desinfektion*, im Handbuch der Hygiene (*Weyl-Gärtner*), 2. Aufl, **8**, 1051, 1922.

Axioms die Reaktion zwischen Quecksilber und Zellsubstanz, also vornehmlich Eiweiß, als *einfache Salzbildung* denken, denn dies ist die Reaktionsweise der Ionen; es müßte also das Quecksilberion mit einem sauren Eiweißrest zusammentreten, während zwei andere, positiv geladene Valenzen das Eiweiß verlassen und die Chloridionen des Sublimats absättigen. Denkt man an sogenannte „Adsorption" von Quecksilberionen, so würde das chemisch entweder ebenfalls eine Salzbildung durch Neutralisation zweier negativer Ladungen des Adsorbens bedeuten oder der Bildung eines *positiv* geladenen Komplexions entsprechen. Diese letzte Vorstellung scheidet wohl sofort für jeden aus, dem die chemische Natur des Quecksilbers einigermaßen vertraut ist. Die einfache Salzbildung ist an sich möglich, aber ich meine, sie sollte bei den in Frage kommenden Bedingungen, nämlich bei der Gegenwart von Chloriden und Polypeptiden nicht *allein*, ja nicht einmal *vorwiegend* ins Auge gefaßt werden. Denn vielen Metallen, unter den Metallen aber in besonders hohem Maße dem Quecksilber, ist es eigentümlich, Komplexverbindungen und speziell *negativ* geladene Komplexionen zu bilden. Bereits in einer reinen Sublimatlösung sind wesentlich mehr Ionen $HgCl_4''$ als $Hg^{\cdot\cdot}$-Ionen vorhanden, wenn auch das *Molekül* $HgCl_2$ bei weitem alles überwiegt[1]). Sobald aber Sublimat mit anderen Substanzen in Berührung kommt, die sich zur Komplexbildung eignen, so macht sich die „Komplexaffinität" des *Moleküls* in energischer Weise geltend, d. h. das *Molekül* $HgCl_2$ (ohne intermediäre Bildung von $Hg^{\cdot\cdot}$-Ionen) lagert sich weitere Atome oder Atomgruppen an. Dies können Halogenatome sein, aber ebenso der Cyanid- oder Rhodanidrest und, soweit sich irgend urteilen läßt, auch Aminosäurenreste; analog muß sich Eiweiß verhalten. Sind *mehrere* Komplexpartner des Sublimats gleichzeitig mit diesem in Berührung, so treten sie in *Konkurrenz* um die „Komplexaffinität" des Sublimats, wie bei den Halogeniden und Cyanid leicht zu zeigen ist. Mir scheint die Vorstellung nicht nur erlaubt, sondern geradezu geboten, daß auch Eiweiß die „Komplexaffinität" des Sublimat*moleküls* absättigen kann. Macht man sich dies zu eigen, so versteht man auch unter Ausschaltung von Ionen, warum die Gegenwart von Kochsalz oder gar von Jodid die Wirkung des Sublimats auf das Eiweiß abschwächen muß: ein Teil der „Komplexaffinität" ist bereits beschlagnahmt und kann sich nicht mehr gegen das Eiweiß richten.

Leider sind unsere Kenntnisse über die *Größe* der „Komplexaffinität" gegenüber den verschiedenen Atomgruppen nur ganz oberflächlich und lückenhaft; es läßt sich daher nicht in hinreichendem Umfange nachprüfen, bis zu welchen Grenzen *diese* Seite der chemischen

[1]) Vgl. z. B. *Sherill*, Zeitschr. f. physik. Chem. **43**, **735**, **1903**.

Kraftäußerung des Sublimats die Erscheinungen beherrscht. Daß sie nicht die geringfügigste ist, kann kaum bezweifelt werden, und deshalb sollte sie mehr in Rechnung gestellt werden als bisher üblich ist.

Mir scheint, daß es eine Tatsache gibt, die *nur* von diesem Gesichtspunkte aus verstanden werden kann: es kann nach allen vorliegenden Beobachtungen kaum daran gezweifelt werden, daß Quecksilberjodid (bei fehlendem Überschuß von Alkalijodid) wesentlich stärker ätzend wirkt als die äquivalente Konzentration Sublimat; die Konzentration an Quecksilberionen ist aber beim Jodid sicher viel geringer als beim Chlorid[1]). Die Neigung zur Komplexbildung mit Eiweiß könnte jedoch beim Jodid erheblich größer sein. Unmittelbar *schließen* kann man das aus der größeren Komplexaffinität zwischen Quecksilber- und Alkalijodid im Vergleich zu der entsprechenden Kombination der Chloride nach meiner Ansicht nicht, denn wie bei jeder Art von Affinität handelt es sich um Beziehungen zwischen *zwei* Partnern und Übertragung der Reaktionsneigung gegenüber einer bestimmten Substanz auf jede beliebige andere wäre verfehlt. Diese Überlegung schützt auch davor, in der starken Neigung des Quecksilber*cyanids* zur Komplexbildung mit Alkalicyaniden (und auch mit Halogeniden) ein Argument *gegen* die Bedeutung der Komplexbildung für die Quecksilber*wirkung* zu sehen: bekanntlich ist das Cyanid durchweg viel schwächer wirksam als das Chlorid, und man erblickt darin eine wichtige Stütze des Ionenaxioms, weil das Cyanid in der Tat *noch* weniger Ionen bildet als das Chlorid (bis zu etwa 10^{-11} gegen 10^{-8} Mol). Ehe man aber *weiß*, wie sich die Größe der Komplexaffinität gegenüber Eiweiß beim Cyanid im Vergleich zum Chlorid verhält, muß man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß sie wesentlich geringer und daß dieser Unterschied neben oder vor der Differenz der Dissoziation von Bedeutung ist.

In erfreulicher Weise stimmen zu den geäußerten Anschauungen Mitteilungen von *Rakusin* und *Nesmejanow*[2]), die mir erst kurz vor Ausführung der Korrektur bekannt wurden: in seinem Verhalten gegenüber Adsorbentien entspricht Sublimat *nichtdissoziierten* Verbindungen; Kaolin und Tonerde adsorbieren fast nichts, aktivierte Holzkohle fast alles, und unter 34 Metallchloriden weist gerade Sublimat das Maximum der Adsorbierbarkeit an Holzkohle auf. Aus einer Lösung von Kaliumquecksilberjodid adsorbiert Tierkohle das gesamte Quecksilberjodid, dagegen kein Jodkalium; hier ist also offenbar eine stärkere Kraft als die „Komplexaffinität" zwischen den beiden Jodiden imstande, das Quecksilberjodidmolekül als Ganzes aus dem Komplex zu lösen und an sich zu ziehen.

Gegenbauer[3]) hat in Sublimatlösungen Stücke von koaguliertem Serumeiweiß gebracht und die dabei eintretende Änderung des Quecksilber- und

---

[1]) *Sherill*, a. a. O., und andere.
[2]) Münch. med. Wochenschr. 1923, S. 1409.
[3]) Arch. f. Hyg. **90**, 23, 1921.

des Chlorgehaltes der Lösung analytisch bestimmt. Er fand, daß im großen ganzen *äquivalente* Mengen durch das Eiweiß aufgenommen wurden, was mit der Annahme einer „Anlagerungsverbindung“, einer Komplexbildung übereinstimmt. Durch kontinuierliches Waschen konnte er allerdings aus dem Koagulum *mehr* Chlor als Quecksilber entfernen, doch beweist dies nach meiner Ansicht nichts für das Wesen der primären Reaktion.

Besonders nachdrücklich hat sich in den letzten Jahren *J. Schumacher* dafür eingesetzt, daß die Metallwirkungen, darunter auch die Sublimatwirkung den *Ionen* zuzuschreiben seien. Soweit ich sehe, stützt er sich im wesentlichen auf folgende tatsächlichen Befunde[1]): Lösungen von Leucomethylenblau werden durch Luftsauerstoff bei Gegenwart von Quecksilberchlorid, Silbernitrat und Goldchlorid viel rascher gebläut als ohne Metallgegenwart; die Beschleunigung ist bei den beiden letztgenannten Metallsalzen allerdings wesentlich größer als bei Sublimat. Werden Ausstriche von Eiter mit Metallsalz (Silbernitrat) behandelt, ausgewaschen und danach in Leucomethylenblau getaucht, so bläuen sich die Kerne der Leucocyten und die Bakterien sofort, ohne Metallvorbehandlung dagegen viel langsamer. Bei Verwendung *komplexer* Metallsalze in gleicher Weise ist der Effekt viel geringer oder gleich Null. Extraktionsmittel, die *Nucleinsäure* lösen, heben die Fixation von Metall im Zellkern und im Bakterienleib auf. *Schumacher* hält die Bildung echter (einfacher) Metallsalze der Nucleinsäure für den elementaren chemischen Vorgang bei der Metallwirkung.

Seine Beweisführung ist nicht absolut zwingend. Komplexbildung *kann*, aber *muß* nicht die katalytische Wirkung eines Metalls aufheben; so ist zwar Ferrocyankalium katalytisch unwirksam, Hämoglobin dagegen nicht, wenn es auch gegen anorganisches Eisen zurücksteht. Aber selbst dann, wenn man die Reduktion des Leucomethylenblaus der Zahl der anwesenden Metallionen quantitativ parallel setzen will, folgt aus *Schumachers* Versuchen an *toten*, nach der Metallbehandlung ausgewaschenen Zellen noch nicht mit hinreichender Zuverlässigkeit, daß in der lebenden Zelle die Bildung von nucleinsaurem Metallsalz der *einzige*, der *erste* oder selbst nur der *wichtigste* chemische Prozeß ist. Auch sein Befund an silberbehandelten Hefezellen, die *nachher* durch Hitze fixiert und mit Wasser ausgewaschen waren und in deren Kernen er dann Silber nachwies[2]), reicht für eine solche Schlußfolgerung nicht aus, ganz gewiß nicht für das Quecksilber. Denn recht bemerkenswert ist auch in seinen Reagenzglasversuchen der große Unterschied zwischen dem gut dissoziierten Silbernitrat und dem kaum Ionen bildenden Sublimat.

Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß *J. F. Clark*[3]) bereits zu der Anschauung kam, die $Hg^{\cdot\cdot}$-Ionen könnten nicht das wesentliche bei der Quecksilberwirkung sein, wenn er auch statt dessen dem komplexen Ion $HgCl_4''$ den Hauptanteil zuschrieb.

Es liegt mir natürlich vollständig fern, *Wirkungen von Quecksilberionen* bestreiten zu wollen. Zunächst sind ja Quecksilbernitrat, -sulfat und -acetat auch in chloridarmem Medium keineswegs ungiftig, und selbstverständlich darf man die Analogie zu sicheren Wirkungen

[1]) Vgl. diese Zeitschr. **133**, 398, 1922.
[2]) Med. Klinik 1922, S. 159.
[3]) Journ. of phys. Chem. 5, 113, 1901.

metallischer Ionen nicht aus den Augen lassen. Aber manche *quantitativen* Tatsachen im Bereiche der Quecksilberwirkungen und vielleicht auch die qualitativen Eigentümlichkeiten in der Wirkung *verschiedener* Metalle scheinen mir leichter verständlich, wenn man den Blick nicht nur starr auf die Ionen gerichtet hält, sondern auch die Möglichkeit der Komplexbildung zwischen Metallsalz und Polypeptid in Erwägung zieht. Soviel ich zu erkennen vermag, ist in *dieser* Richtung eine viel größere Variabilität der Affinitätsbeziehungen (im weitesten Sinne) und damit eine Aufklärung *elektiver* Metallwirkungen zu erwarten, wie sie gegenüber Mikroorganismen und gegenüber Organelementen bekannt sind.

Versuche über den N-Stoffwechsel bei der Avitaminose.

Von

J. A. Collazo (Montevideo, S.-A.).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 8. Januar 1924.)

Im folgenden will ich kurz über Versuche berichten, auf die schon *Alpern* (1) und *Adachi* (2) in ihren Arbeiten Bezug genommen haben, und die sich auf den Harnsäure-, Allantoin-, Purinstickstoff-, Ammoniak-, Aminosäure-, Harnstoff- und Phosphorsäuregehalt des Urins, wie auf den Reststickstoff-, Harnstoff- und Aminosäuregehalt des Blutes bei *vitaminfrei*[1]) ernährten *Hunden* beziehen.

Im Urin (3) wurde die Harnsäure nach *Folin*, das Allantoin nach *Wiechowski*, der Purinstickstoff nach *Krüger*, der Harnstoff nach *Folin*, die Phosphorsäure nach *Neubauer* bestimmt. Die Blutanalysen wurden nach *Bang* (4) gemacht.

Als Versuchstiere dienten drei Hunde. Der erste wurde 5 Wochen beobachtet und starb dann infolge skorbutischer Darmblutungen. Der zweite Hund war 12 Wochen im Versuch und starb an seiner Avitaminose. Der dritte Hund wurde 16 Wochen beobachtet und starb dann ebenfalls an seiner Avitaminose. Die ersten beiden waren junge Hunde, der letzte war 2 bis 3 Jahre alt. Das Körpergewicht betrug 8, 10 und 13 kg. Ich habe wöchentlich einmal jedes Tier 24 Stunden in den Stoffwechselkäfig gesetzt, die 24stündige Harnmenge, soweit sie von den Tieren spontan entleert wurde, gesammelt und analysiert. An diesem Tage und außerdem ein- oder zweimal an anderen Tagen

---

[1]) Die Nahrung bestand aus 50 g Pferdefleisch = 7,02 g N, 50 g poliertem Reis = 0,262 g N, 30 g Schweineschmalz (vitaminfrei gemacht nach dem üblichen Verfahren des Laboratoriums), 3 g Salzgemisch.

der Woche wurden die Blutanalysen gemacht. Die tägliche Nahrungsration fraßen die Tiere unter meiner Leitung restlos auf.

Das Ergebnis meiner Versuche war folgendes:

1. *Der Purinstickstoff des Urins steigt mit der fortschreitenden Avitaminose leicht an; kurz vor dem Tode kann er wieder auf den Ausgangspunkt absinken.*

2. *Der Harnsäuregehalt des Urins zeigt uns bei länger dauernder Krankheit eine gewisse Vermehrung; kurz vor dem Tode kann er wieder sinken.*

3. *Der Allantoingehalt weist Schwankungen sowohl bei kürzerer, als ganz besonders bei länger dauernder Krankheit auf, und zwar deutliche Neigung zur Vermehrung; kurz vor dem Tode kann er wieder abfallen.*

4. *Die Werte für die Harnsäure und Allantoin gehen teils parallel, teils divergieren sie.*

5. *Der Ammoniak- und Aminosäuregehalt des Harns steigt mit der fortschreitenden Avitaminose allmählich an; kurz vor dem Tode stellt sich eine Senkung ein.*

6. *Der Harnstoff des Harns vermindert sich kontinuierlich.*

7. *Der Phosphorsäuregehalt des Urins hält sich in der ersten Zeit in ungefähr normalen Grenzen; in der späteren Zeit bei stark sinkendem Körpergewicht zeigt er eine deutliche Neigung zur Vermehrung.*

8. *Der Reststickstoff des Blutes zeigt bei fortschreitender Avitaminose eine leichte Steigerung, es ist aber auffallend, wie lange Zeit er normal bleiben kann.*

9. *Der Harnstoffgehalt des Blutes ist bei kurzdauernder Krankheit unverändert, bei längerer Krankheit scheint er sich etwas zu vermehren.*

10. *Der Aminosäuregehalt des Blutes steigt im allgemeinen bei der Avitaminose langsam an, besonders in den späteren Stadien der Krankheit.*

11. *Die Vermehrung des Rest-N im Blute scheint nach alledem nicht so sehr durch den Harnstoff als durch Aminosäuren bedingt zu sein.*

Wenn auch meinen Beobachtungen deshalb nur bedingter Wert zukommt, weil es sich nicht um vollständig genau durchgeführte Bilanzversuche handelt, so geben sie doch einen allgemeinen Überblick über die Veränderungen im Harn und Blute. Meine Beobachtungen über den Harnsäure- und Allantoingehalt des Harns stimmen mit den Ergebnissen von *Adachi* überein und gehen hinsichtlich des Rest-N- und Aminosäuregehaltes des Blutes mit den Befunden von *Alpern* bei Tauben konform. Die Veröffentlichung meiner vorliegenden orientierenden Arbeit, die schon vor Jahresfrist fertig war, ist zurückgestellt worden, bis der genaue Bilanzversuch von *Adachi* fertig vorlag, damit die eine Arbeit durch die andere kontrolliert werden konnte.

Ohne ausführlich auf die theoretische Bedeutung meiner Befunde hier einzugehen, will ich nur folgendes hervorheben, was mir von besonderer Wichtigkeit für die Kenntnis des N-Stoffwechsels bei der Avitaminose zu sein scheint.

Der *Purinstoffwechsel*, der nach *Magnus-Lewy* (5) *unabhängig vom übrigen N-Stoffwechsel verläuft* und seinen eigenen Gesetzen folgt, *zeigt vor allem die Störung im Kernstoffwechsel an.* Eine solche Störung tritt nach meinen Versuchen erst *im späteren Stadium* einer länger dauernden Avitaminose auf. Die Vermehrung der Harnsäureausscheidung kann bei gleicher Ernährung wohl nur auf einer Neigung der Dissimilation beruhen.

Das auffallendste Symptom im übrigen N-Stoffwechsel ist die Herabsetzung des Harnstoffs des Harns, während der Aminosäure- und Ammoniakgehalt steigt. Ob das darauf beruht, *daß die Desaminierung und die Decarboxylierung gestört ist, daß also eine Störung in der harnstoffbildenden Leberfunktion vorliegt, wie ich ja auch Störungen der Leberfunktion am intermediären Kohlehydratstoffwechsel nachweisen konnte,* kann aus meinen Versuchen noch nicht geschlossen werden.

Diese hier kurz skizzierten Störungen des intermediären N-Stoffwechsels kommen auch bei der Blutuntersuchung zum Ausdruck, wie ich nachweisen konnte.

Da alle diese Änderungen im N-Stoffwechsel erst in den Spätstadien namhaft werden, so geht daraus hervor, *daß der N-Stoffwechsel in der Avitaminose jedenfalls viel später gestört ist als der Kohlehydrat- und der Fettstoffwechsel.*

Um jedoch alle hier aufgeworfenen Fragen in einer definitiven Weise beantworten zu können und insbesondere, um entscheiden zu können, ob die beobachtete Störung der Harnstoffbildung auf einer primären avitaminotischen Störung der harnstoffbildenden Leberfunktion beruht, oder ob hier andere Ursachen eine Rolle spielen — das kann nur durch vollständig durchgeführte Bilanzversuche unter verschiedenen Versuchsbedingungen entschieden werden, womit zurzeit Herr Dr. *Yosihue* in unserem Laboratorium beschäftigt ist.

Literatur.

1) *D. Alpern*, Untersuchungen über den Reststickstoffgehalt des Blutes bei avitaminösen und hungernden Tauben, diese Zeitschr. **138**, 1923. — 2) *A. Adachi*, Über den Harnsäure- und Allantoinstoffwechsel bei Avitaminose, diese Zeitschr. **148**, 1923. — 3) *Neubauer-Huppert*, Analyse des Harns, 11. Aufl., 1913. — 4) *J. Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, 1922; diese Zeitschr. **72**. — 5) *Magnus Lewy*, v. Noordens Lehrb. d. Pathol. d. Stoffwechsels **1**, 2. Aufl., 1907.

Versuchsprotokolle.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Harnversuch						Blutversuch nach *Bang*			
	Purine				Stickstoff		N-Intermediärstoffwechsel			
Dauer der avitaminösen Fütterung in Wochen	Allantoin nach *Wiechowski* in 24 St.	Harnsäure nach *Folin* in 24 St.	Purin-N nach *Krüger* in 24 St.	Phosphorsäure nach *Neubauer* in 24 St.	NH_3 + Aminosäure nach *Sörensen-Rochese* in 24 St.	Harnstoff nach *Folin* in 24 St.	Rest-N	Harnstoff-N	Aminosäuren-N	Körpergewicht kg
				Avitaminose-Hund Nr. 1.						
Vorher	0,307 0,350	0,012 0,009	0,129 0,113	0,900 0,940	0,93 1,02	10,2 10,0	0,020	0,016	0,009	8,0
1	0,307	0,012	—	0,641	0,62	9,3	0,021 0,018 0,017	0,013 0,019 0,011	0,011 0,009 —	8,0
2	—	0,009	0,130	0,841	0,71	9,6	0,030 0,026 0,022	0,018 0,019 0,021	— — 0,019	7,8
3	—	0,011	0,106	0,969	0,93	8,9	0,027 0,019 0,021	0,017 0,016 0,011	0,029 0,031 0,019	7,0
4	0,551	—	0,161	1,21	1,31	9,2	0,029 0,027 0,031	0,011 — —	0,025 0,021 0,030	6,5
5 †	0,607	0,015	0,211	1,30	2,02	6,1	0,041 0,036 0,021	0,031 0,022 0,013	0,011 0,016 0,009	6,1
				Avitaminose-Hund Nr. 2.						
Vorher	0,311	0,019	0,160	0,893	0,631	9,01	0,030 0,036	0,016 0,015	0,020 0,015	10,0
1	0,309	0,021	—	0,939	0,891	9,33	0,036 0,037 0,030	0,019 — 0,016	0,018 — 0,019	10,5
2	0,506	0,019	0,181	0,996	1,16	9,21	0,029 0,041	0,016 0,019	0,019 0,029	10,0
3	0,391	0,031	0,131	1,460	—	9,31	0,022	0,019	0,019	9,8
4	0,461	0,025	—	0,939	1,39	8,4	0,038 0,036 0,039	0,016 0,019 0,021	0,026 0,021 0,020	9,6
5	0,361	0,026	—	1,26	—	6,3	0,047 0,059 0,055†	0,026 0,034 0,030	0,023 0,030 0,028	9,0
6	0,760	0,029	—	2,39	0,91	5,21	0,045 0,063 0,051	0,024 0,034 0,029	0,021 0,019 0,024	8,7
7	0,863	0,039	—	1,96	—	4,36	0,039 0,046 0,051	0,020 0,026 0,031	0,024 — —	8,2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Harnversuch						Blutversuch nach *Bang*			
	Purine				Stickstoff		N-Intermediärstoffwechsel			
Dauer der avitaminösen Fütterung in Wochen	Allantoin nach *Wechowski*	Harnsäure nach *Folin*	Purin-N nach *Krüger*	Phosphorsäure nach *Neubauer*	NH_3 + Aminosäure nach *Sörensen-Rochese*	Harnstoff nach *Folin*	Rest-N	Harnstoff-N	Aminosäuren-N	Körpergewicht
	in 24 St.	in 24 St.	in 24 St.	in 24 St.	in 24 St.	in 24 St.				kg
Avitaminose-Hund Nr 2. (Fortsetzung.)										
8	0,472	0,041	0,143	2,31	2,88	7,91	0,061 0,039 0,053	0,020 0,014 0,021	0,040 0,023 0,039	8,00
9	1,072	0,036	0,361	2,76	3,16	6,63	0,100 0,103	0,041 0,029	0,067 0,079	7,40
10	0,760	0,041	0,261	3,16	2,96	5,41	0,142 0,140 0,150	0,039 0,040 0,029	0,101 0,103 0,121	7,00
11	0,930	0,039	0,283	2,99	2,98	7,11	0,098 0,130 0,120	0,036 0,059 0,041	— 0,076 0,078	6,70
12†	0,801	0,051	0,210	1,68	1,26	6,64	0,147 0,113 0,120	0,040 0,029 0,031	0,103 — 0,090	6,30
Avitaminose-Hund Nr. 3.										
Vorher	0,301	0,013	0,140	1,03	0,491	13,3	0,029	0,012	0,017	13,00
1	0,339	0,016	—	1,00	1,16	11,3	0,031 0,038 0,041	0,016 0,019 0,015	0,019 0,018 0,026	12,95
2	—	—	—	0,903	0,63	10,1	— — 0,051	0,016 0,019 0,016	0,030 0,026 0,025	12,90
3	0,316	0,021	0,110	0,936	1,00	11,2	—	—	—	13,00
4	0,490	0,020	0,150	0,860	0,92	7,2	—	—	—	12,70
5	—	—	0,160	0,941	0,86	7,1	0,039 — 0,046	— 0,018 —	— — —	12,50
6	—	—	0,109	0,987	0,71	9,3	0,049 0,049 0,049	0,019 0,031 0,021	0,031 0,020 0,026	12,40
7	0,763	0,031	0,241	1,09	0,70	6,4	— — 0,063	0,030 — 0,021	0,039 — 0,039	12,20
8	0,836	0,039	0,273	1,40	0,93	7,2	0,056	0,019	0,036	12,00
9	0,607	0,037	0,211	0,941	1,91	8,2	0,107 0,103 0,097	0,031 0,027 0,030	0,079 0,069 0,061	11,90
10	0,906	—	0,303	2,02	1,12	6,4	0,091	0,030	0,051	11,00
11	0,993	0,041	0,360	3,03	2,08	4,9	0,047 0,039	0,020 0,018	0,031 0,021	11,10

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Harnversuch						Blutversuch nach *Bang*			
	Purine				Stickstoff		N-Intermediärstoffwechsel			
Dauer der avitaminösen Fütterung in Wochen	Allantoin nach *Wiechowski* in 24 St.	Harnsäure nach *Folin* in 24 St.	Purin-N nach *Krüger* in 24 St.	Phosphorsäure nach *Neubauer* in 24 St.	NH_3 + Aminosäure nach *Sörensen-Rochese* in 24 St.	Harnstoff nach *Folin* in 24 St.	Rest-N	Harnstoff-N	Aminosäuren-N	Körpergewicht kg
Avitaminose-Hund Nr. 3. (Fortsetzung.)										
12	0,920	0,031	0,301	2,09	3,1	7,6	0,062 0,060 0,050	0,021 0,020 0,020	0,040 0,039 0,033	10,70
13	0,720	0,036	0,240	3,02	0,93	6,3	0,073	0,029	0,047	10,10
14	0,610	0,040	0,201	4,16	2,21	5,0	0,091 0,120 0,130	0,026 0,036 —	0,060 0,090 —	9,50
15	0,621	0,051	0,191	2,01	2,18	4,0	0,106 0,094 0,104	0,029 0,031 0,050	0,093 0,061 0,060	9,00
16 †	0,428	0,051	0,280	1,89	1,2	6,3	0,121 0,116 0,120	0,069 0,071 0,066	0,040 0,039 0,060	8,20
Hunger-Hund Nr. 4.										
Vorher	0,291	0,016	0,096	0,961	0,499	9,3	0,029	0,012	0,017	9,00
1	0,180	0,019	0,063	0,899	3,16	6,1	0,028 0,039 0,063	0,011 0,016 0,029	0,021 0,018 0,035	9,15
2	0,810	0,010	0,281	1,649	2,16	5,6	0,059	0,019	0,036	7,90
3	0,611	0,009	0,199	1,361	0,96	5,6	0,030 0,032 0,041	0,009 0,019 0,016	0,020 0,021 0,030	7,60
4	0,396	0,016	0,112	1,210	—	4,9	0,049 0,087 0,073	0,028 0,021 0,035	0,020 0,069 0,040	6,50

Über die Umwandlung der Chinasäure durch die Pilze.

Von

Wl. Butkewitsch.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium des staatlichen biologischen *Timirjazeff*-Instituts und aus der landwirtschaftlichen Akademie Petrowsko-Rasumowskoje, Moskau.)

(Eingegangen am 8. Januar 1924.)

In den Kulturen von *Citromyces*- und *Penicillium*arten auf dem Natriumsalz der Chinasäure läßt sich — wie von mir schon mitgeteilt wurde[1]) — das Auftreten einer schönen violett- oder kirschroten Färbung beobachten, die sich allmählich verstärkt und manchmal eine sehr bedeutende Intensität erreicht; meist wird die Färbung darauf schwächer und schwächer und verschwindet schließlich vollständig. Die rote Färbung kam nur bei alkalischer oder neutraler Reaktion der Kulturflüssigkeit zum Vorschein und verschwand bei der Ansäuerung. Von diesen Verhältnissen ausgehend, sprach ich die Vermutung aus, daß auch die Entfärbung der Nährlösung in den Pilzkulturen durch die Reaktionsänderung in der Lösung bedingt wird. Diese Annahme hat sich aber nicht als richtig erwiesen. In den älteren Kulturen gelang es nämlich nicht, die verschwundene Färbung durch Laugezusatz wieder hervorzurufen. Das Auftreten und Verschwinden der Färbung in der Kulturflüssigkeit stand also offenbar damit im Zusammenhang, daß die färbenden Stoffe sich darin intermediär bildeten und später wieder verzehrt wurden.

Durch nähere Untersuchung der betreffenden Erscheinungen wurde festgestellt, daß sie sich an die Bildung von Phenolderivaten knüpfen, die als Umsatzprodukte der Chinasäure in den Pilzkulturen entstehen und die Farbreaktion mit dem in der Kulturflüssigkeit befindlichen Eisen geben. Das häufigste Produkt scheint dabei die *Protocatechusäure* zu sein.

---

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129**, 464, 1922; Versuch 6.

Bisher wurde die biochemische Bildung der Protocatechusäure nur unter Einwirkung gewisser Bakterien auf Chinasäure beobachtet[1]). Wie aber aus den weiter unten mitgeteilten Ergebnissen ersichtlich ist, stellt eine solche Umwandlung der Chinasäure eine weit verbreitete Erscheinung bei den Pilzen dar, und sie scheint die Entwicklung derselben auf dieser Säure stets zu begleiten. Die Bildung der die Farbreaktion mit Eisenchlorid gebenden Phenolderivate ließ sich jedenfalls in den Kulturen auf Chinasäure bei allen Vertretern von *Aspergillaceae* nachweisen, die in unseren Versuchen geprüft wurden.

Die in den Pilzkulturen auf Chinasäure entstehenden Produkte.

Versuchsreihe 1.

Kultur von Aspergillus niger auf Chinasäure bei relativem Stickstoffmangel mit Calciumcarbonat[2]).

Bei diesem Versuch kam eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung zur Anwendung:

Chinasäure	20	Proz.
$CaCO_3$	3	„
NH_4NO_3	0,15	„
Salze (mit Zn)	0,1	„

Die Kultur enthielt 50 ccm Nährlösung. Nach Entwicklung der Pilzdecken wurden noch 6 g durch Erhitzen sterilisierter Kreide zugesetzt. Die Kultur dauerte fast 10 Wochen bei einer Temperatur von etwa 20°.

Aus der vom Niederschlag und Mycel[3]) abfiltrierten Kulturflüssigkeit wurde das in ihr gelöste Calcium durch Oxalsäure entfernt, das Filtrat vom Calciumoxalat auf dem Wasserbade bis zur Trockne abgedampft und der Rückstand, der hauptsächlich die unverbraucht gebliebene Chinasäure enthielt, der Extraktion mit Äther unterzogen. Nach dem Verdunsten des Ätherextraktes blieb ein kristallinischer Rückstand, der sich leicht in Wasser löste. Die wässerige Lösung reagierte stark sauer und gab mit Eisenchlorid eine intensive blaugrüne Färbung, die auf Zusatz von Natriumcarbonat nach Dunkelkirschrot umschlug. *Fehling*sche Lösung färbte sich beim Hinzufügen dieser Lösung smaragdgrün; nach dem Kochen ließ sich eine schwache Reduktion durch Bildung eines geringen roten Niederschlages beim Stehenlassen nachweisen. Aus der durch Abdampfen eingeengten und

[1]) *O. Loew*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **14**, 450, 1881; *O. Emmerling* und *E. Abderhalden* (Micrococcus chinicus), Centralbl. f. Bakt. (2) **10**, 337, 1903; *M. W. Beijerinck*, Folia microbiol. **1**, 1912, zitiert nach *H. J. Waterman*, Centralbl. f. Bakt. (2) **42**, 639 (647), 1915.

[2]) Diese Kultur diente auch zur Prüfung der Fähigkeit von *Aspergillus niger*, die Citronensäure auf Chinasäure zu bilden. Vgl. *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **142**, 195, 1923; Versuchsreihe 1.

[3]) Im Niederschlag und Mycel dieser Kultur wurde Oxalsäure nachgewiesen. Vgl. die soeben zitierte Mitteilung.

im Exsikkator stehengelassenen wässerigen Lösung schieden sich nadelförmige Kristalle aus, die unter dem Mikroskop als an den Enden zugespitzte Prismen ganz ähnlich wie die Kristalle der Protocatechusäure aussahen. Diese Kristalle wurden nach dem Trocknen bei etwa 110⁰ gewogen, wieder in Wasser gelöst und mit n/10 $Ba(OH)_2$-Lösung ($FeCl_3$ als Indikator) bis zum Umschlage von grüner Farbe nach Rot titriert. Auf 0,0585 g Substanz wurden 3,6 ccm n/10 $Ba(OH)_2$ verbraucht. Die Titration derselben Menge Protocatechusäure unter denselben Bedingungen erforderte 3,8 ccm n/10 $Ba(OH)_2$.

Alle oben angegebenen Eigenschaften der geprüften Substanz würden also der *Protocatechusäure* entsprechen.

Neben den Kristallen der Protocatechusäure waren auch andere prismatische Kristalle in dem aus dem Ätherextrakt ausgeschiedenen Präparat vorhanden, die sich von jenen dem Aussehen nach unterschieden und einen verhältnismäßig niedrigen Schmelzpunkt von 100 bis 110^0 hatten. Wahrscheinlich war dies *Brenzcatechin*, dessen Schmelzpunkt bei einer Temperatur von 105^0 liegt.

Der im Äther unlösliche Rückstand stellte die in der Kultur unverbraucht gebliebene Chinasäure dar und machte beinahe die Hälfte der der Nährlösung zugesetzten Säure aus (5,37 g). Nach Umkristallisieren dieses Rückstandes aus Wasser ergab die Titration der abgewogenen Menge desselben mit n/10 $Ba(OH)_2$ (Phenolphthalein als Indikator) folgendes Resultat: Auf 0,272 g Substanz wurden 14,3 ccm n/10 $Ba(OH)_2$ verbraucht. Auf dieselbe Menge der Chinasäure berechnet, müssen 14,5 ccm verbraucht werden.

Versuchsreihe 2.

Kulturen von Citromyces glaber auf Chinasäure und ihrem Natriumsalz bei relativem Stickstoffmangel.

Es wurden zwei Kulturen auf Nährlösungen von folgender Zusammensetzung aufgestellt:

a)	Chinasäure	10 Proz.
	NH_4NO_3	0,15 „
	Salze (mit Zn)	0,1 „
b)	dasselbe wie in a) und außerdem	
	Na_2CO_3	2 Proz.
	(freie Säure beinahe.	2 „)

Jede Kultur enthielt 50 ccm Nährlösung. Die Kulturen wurden im Thermostaten bei einer Temperatur von 23 bis 25^0 stehengelassen.

Nach 2 Tagen bildeten sich gute Pilzdecken in beiden Kulturen, und die Kulturflüssigkeiten färbten sich gelblichgrün. Am siebenten Tage zeigte sich eine kirschrote Farbe in der Kultur mit Na_2CO_3. Anfangs trat die Färbung in der Nähe vom Mycel auf; danach verteilte sie sich auf die ganze Flüssigkeit. In der Kultur ohne Na_2CO_3 erhielt sich die gelblichgrüne Farbe bis zum Schluß des Versuchs. Nach etwa 2 Wochen wurden die beiden Kulturen der Analyse unterzogen, nachdem sie durch Erhitzen im *Koch*schen Sterilisator abgetötet worden waren.

Pilzdeckengewicht: a) 0,5575 g, b) 0,6600 g.

Die Flüssigkeit aus der Kultur a) reagierte stark sauer, gab eine starke blaugrüne Färbung mit $FeCl_3$, die beim Zusatz von Na_2CO_3 nach Kirschrot umschlug, und reduzierte stark ammoniakalische Silbernitratlösung in der Kälte. Die *Fehling*sche Lösung bekam nach Zusatz der Kulturflüssigkeit eine smaragdgrüne Farbe; nach dem Kochen und Stehenlassen schied sich ein geringer roter Niederschlag aus. — Oxalsäure enthielt diese Kultur nicht.

Man ließ die Kulturflüssigkeit auf dem Wasserbade bis zur Trockne eindampfen, zerrieb den trockenen Rückstand im Mörser und unterzog ihn der Extraktion mit Äther. Der beim Abdampfen des Ätherextraktes erhaltene Rückstand machte beinahe 0,15 g aus und löste sich in kaltem Wasser nur teilweise auf.

Die wässerige Lösung der aus dem Ätherextrakt ausgeschiedenen Substanzen reagierte sauer und gab alle oben genannten, für *Protocatechusäure* und *Brenzcatechin* charakteristischen Reaktionen[1]). Das Aussehen der Kristalle unter dem Mikroskop sowie auch die bei der Titration mit $Ba(OH)_2$ erhaltenen Ergebnisse wiesen darauf hin, daß ein Gemenge dieser Verbindungen vorzuliegen schien.

Die nach Einengen der wässerigen Lösung durch Abdampfen erhaltene kristallinische Substanz, die 0,074 g wog, wurde in Wasser gelöst und durch n/10 $Ba(OH)_2$ mit $FeCl_3$ als Indikator titriert. Dabei wurden 2,9 ccm $Ba(OH)_2$-Lösung verbraucht. Auf dieselbe Menge Protocatechusäure berechnet, müßten 4,8 ccm verbraucht werden.

Der in kaltem Wasser unlösliche Teil des aus dem Ätherextrakt stammenden Rückstandes löste sich in heißem Wasser auf und schied sich als ein gelblich gefärbter Niederschlag aus der Lösung beim Abkühlen wieder aus. Dieser Niederschlag erwies sich unter dem Mikroskop als aus prismatischen Kristallen bestehend, die teilweise in Kreuzen und Drusen kombiniert waren und sich auch bei mikroskopischer Beobachtung gelb gefärbt zeigten[2]). In heißem Wasser gelöst, gaben diese Kristalle keine Farbreaktionen mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3 und reduzierten stark *Fehling*sche Lösung. Bei Zusatz von Na_2CO_3 gingen sie ohne Erhitzen leicht in Lösung, die bräunlich gefärbt wurde.

Der in Äther unlösliche Rückstand bestand nur teilweise aus unverbraucht gebliebener Chinasäure; ein Teil desselben löste sich in Wasser auch unter Erwärmen schwer auf. Die Lösung färbte sich mit $FeCl_3$ grünlich und nach Zusatz von Na_2CO_3 braun.

Die Flüssigkeit aus der Kultur b) (Chinasäure + Na_2CO_3) reagierte neutral und enthielt *Oxalsäure*. Durch Abdampfen eingeengt, wurde

---

[1]) Mit Eisenchlorid, ammoniakalischer Silbernitratlösung und *Fehling*scher Lösung verhält sich Brenzcatechin ähnlich der Protocatechusäure.

[2]) Dem Aussehen nach ähnelte diese Substanz dem Chinon, aber sie hatte keinen diesem eigentümlichen Geruch.

sie mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Beim Ansäuern der Flüssigkeit fiel ein flockiger Niederschlag aus; er ging beim Ausschütteln mit Äther in die Ätherschicht über, löste sich aber nicht darin auf.

Beim Abdampfen des abfiltrierten Ätherextraktes schieden sich nadelförmige Kristalle aus, die denen der *Protocatechusäure* ähnlich sahen. Ihre wässerige Lösung reagierte sauer und gab alle für diese Säure charakteristischen Reaktionen.

Der beim Zusatz der Schwefelsäure sich bildende Niederschlag wurde nicht näher untersucht. Vielleicht bestand er aus denselben, in Wasser schwer löslichen Substanzen, die auch bei der Untersuchung der Flüssigkeit von der Kultur *a* nachgewiesen worden waren.

Versuchsreihe 3.

Einwirkung der Pilzdecken von Aspergillus niger und Citromyces glaber auf Chinasäurelösung.

Es wurden mehrere Kulturen von *Aspergillus niger* und *Citromyces glaber* aufgestellt. Für jede Kultur wurden je 25 ccm Nährlösung gebraucht, die 8 Proz. Rohrzucker, 0,3 Proz. NH_4NO_3 und 0,2 Proz. Salze (mit Zn) enthielt. Nachdem die Pilzdecken eine genügend starke Entwicklung erreicht hatten, wurden die Kulturflüssigkeiten abgegossen, die Pilzdecken wiederholt mit sterilisiertem Wasser abgespült und je 25 ccm sterilisierter 5proz. Chinasäurelösung, die ein wenig Eisenchlorid enthielt, jeder Decke zugesetzt. Die Lösungen mit Pilzdecken wurden bei Zimmertemperatur von etwa 17 bis 20° stehengelassen.

Nach einigen Tagen trat eine grüne Farbe in den Lösungen mit *Citromyces glaber* auf, die bei Zusatz von Na_2CO_3 nach Rot umschlug, und die Flüssigkeit bewirkte eine starke Reduktion in ammoniakalischer Silbernitratlösung ohne Erwärmen. Da die Lösung mit *Aspergillus*-decke fast gar keine Reaktion mit Eisenchlorid aufwies, wurde hier das Natriumcarbonat bis zu schwach alkalischer Reaktion steril zugesetzt. Den Tag darauf färbte sich auch diese Lösung intensiv violett.

Im angegebenen Falle beschleunigte also die alkalische Reaktion die Anhäufung von Phenolderivaten in Chinasäurelösung. Wie aber die weiter unten angeführten Ergebnisse zeigen, findet die Anhäufung dieser Derivate in den Kulturen von *Aspergillus niger* auch auf freier Chinasäure statt.

Die Chinasäurelösung, die fast 4 Wochen der Einwirkung der Pilzdecke von *Citromyces glaber* unter den oben angegebenen Bedingungen ausgesetzt wurde, reagierte schwach sauer. Eisenchlorid färbte die Lösung dunkelgrün und bei Zusatz von Natriumcarbonat schlug die Farbe nicht nach Violettrot, was für Protocatechusäure und Brenzcatechin charakteristisch ist, sondern nach Braun um. Die Flüssigkeit reduzierte stark ammoniakalische Silbernitratlösung in der Kälte und brachte in *Fehling*scher Lösung eine smaragdgrüne Färbung, nach dem Kochen eine schwache Reduktion hervor.

Die von der Pilzdecke abgegossene Flüssigkeit wurde im Wasserbade bis zur Trockne abgedampft. Dabei bildete sich am Boden der Schale eine kristallinische Kruste mit dunkelgrünem, metallenem Schillern, das dem Chinhydron eigentümlich ist.

Wenn hier wirklich *Chinhydron* vorkam, das eine Verbindung von *Hydrochinon* mit *Chinon* darstellt[1]), so ist anzunehmen, daß bei der Umwandlung der Chinasäure durch die Pilze auch diese Benzolderivate sich bilden können.

Mit Äther behandelt, löste sich der beim Abdampfen der Flüssigkeit erhaltene Rückstand nur sehr wenig auf, wobei die Lösung opaleszent war und etwas fluoreszierte. Der ungelöst bleibende Rückstand quoll auf, wurde weich und bildete eine zähe, schmierige Masse. Nach Abdampfen des Äthers wurde sie wieder hart. Ähnlich verhielt sie sich auch mit Wasser. Bei Zusatz von Na_2CO_3 löste sie sich leicht mit brauner Farbe auf. Mit Essigsäure angesäuert, wurde diese Lösung olivgrün und schied einen flockigen Niederschlag aus.

Was die in Wasser unlöslichen gefärbten Substanzen anbetrifft, die bei den oben angegebenen Analysen in den Flüssigkeiten von den Pilzkulturen auf Chinasäure, sowie auch in der durch die Pilzdecke angegriffenen Chinasäurelösung nachgewiesen wurden, so liegt überhaupt die Möglicbkeit nahe, daß diese Substanzen als Produkte der Kondensationen entstehen, die sich gleichzeitig mit den Oxydationen und Dehydrationen geltend machen[2]). In dieser Hinsicht ist die von *Bertrand* gemachte Beobachtung von Interesse, daß die Oxydation des Guajakols (Brenzcatechinmonomethyläther) mit Phenolasen durch eine gleichzeitige Kondensation begleitet werden kann, wobei Tetraguajakolchinon entsteht[3]).

---

[1]) Bekanntlich entsteht Chinhydron meist als ein intermediäres Produkt bei Überführung von Hydrochinon in Chinon. Nach *Marchandier* bildet sich Chinhydron auch bei der fermentativen Oxydation von Hydrochinon. *L. Marchandier*, Journ. Pharm. et Chim. (6) **21**, 299, 1905. — *Beijerinck* fand Benzochinon als Stoffwechselprodukt des Fadenbakteriums *Actinomyces chromogenes* auf und sieht das Pepton im Substrat als die Quelle der Chinonbildung an; *M. W. Beijerinck*, Centralbl. f. Bakt. (2) **6**, 2, 1900. — Vgl. auch *Eller* und *Koch*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **53**, 1469, 1920.

[2]) Vgl. *H. Hahn*, diese Zeitschr. **100**, 114, 1919 und Fermentforsch. **4**, 301, 1921.

[3]) *G. Bertrand*, C. r. de l'acad. des sc. **137**, 1269, 1903 und Ann. de l'Inst. Pasteur **17**, 116, 1914; vgl. auch *H. Cousin* et *H. Hérissey*, C. r. de la soc. de biol. **63**, 471, 1907; C. r. de l'acad. des sc. **146**, 1413, 1908. Auch bei Bläuung der Schnittflächen des Gewebes vieler Hutpilze, wobei sich nach *Bertrand* (C. r. **133**, 1233, 1901) ein Stoff phenolartiger Natur — Boletol — bildet, handelt es sich ebenso wie bei vielen anderen Verfärbungen von Pflanzengewebeflächen um Kondensationen, von denen die partiellen Oxydationen begleitet werden. Vgl. *F. Czapek*, Biochem. d. Pfl. **3**, 126, 1921.

Die Beobachtungen über das Erscheinen und Verschwinden der Farbreaktion mit Eisenchlorid in der Flüssigkeit von den Pilzkulturen auf Chinasäure zeigen, daß die die betreffende Reaktion gebenden Phenolderivate als Zwischenprodukte der Chinasäureumwandlung entstehen, die sich nur intermediär anhäufen. In den älteren Kulturen verschwinden diese Derivate, indem sie eine weitere Verwandlung erleiden. Unter anderem scheinen sie als Material zur Bildung der Oxalsäure verzehrt zu werden, die sich in Anwesenheit der sie bindenden Basen in den Pilzkulturen auf Chinasäure reichlich anhäuft[1]). Das ist aus den Ergebnissen ersichtlich, die in unseren vorigen Mitteilungen[2]) sowie auch weiter unten angeführt werden.

Bildung und Verzehrung der Phenolderivate in den Pilzkulturen auf Chinasäure.

Versuchsreihe 4.

Kulturen von Aspergillus niger, Citromyces glaber, Aspergillus oryzae und Mucor racemosus auf Chinasäure und ihrem Natriumsalz.

In dieser Versuchsreihe wurde die Nährlösung von folgender Zusammensetzung verwendet:

Chinasäure	10	Proz.	(freie Säure etwa 2 Proz.)
Na_2CO_3	2	,,	
NH_4NO_3	0,5	,,	
Salze (mit Zn)	0,1	,,	[3])

Jede Kultur enthielt je 25 ccm Nährlösung. Man stellte drei Kulturen von *Aspergillus niger*, vier Kulturen von *Citromyces glaber* und je eine Kultur von *Aspergillus oryzae* und *Mucor racemosus* auf und ließ alle Kulturen bei Zimmertemperatur von 17 bis 18° stehen.

Die Resultate der Beobachtungen und Analysen sind für die Kulturen von *Aspergillus niger* und *Citromyces glaber* in den weiter unten folgenden Tabellen zusammengestellt.

---

[1]) Außerdem können die Phenolderivate auch als Kohlenstoffquelle bei der Mycelentwicklung durch die Pilze verbraucht werden. Vgl. *F. Czapek*, *Hofmeisters* Beitr. **3**, 47, 1902 und Biochem. d. Pflanzen, 2. Aufl., **1**, 387, 1913 und **3**, 445, 1921; und besonders *H. J. Waterman*, Centralbl. f. Bakt. (2) **42**, 639, 1915. — Für Schimmelpilze fand schon *van Tieghem* (C. r. **65**, 1091, 1867), daß sie Tannin vollständig verbrauchen können. Nach *G. S. Fowler* (Proc. Roy. Soc. **83**, 149, 1911) sollen mehrere Bakterien, darunter auch *Bac. fluorescens liquefaciens*, in Reinkultur Phenol oxydieren. — Über Bakterien, die Benzol und andere Benzolkohlenwasserstoffe zu assimilieren fähig sind, vgl. *K. Störmer*, Centralbl. f. Bakt. (2) **20**, 282, 1907; *R. Wagner*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **4**, 289, 1914; *J. Tausz* und *M. Peter*, Centralbl. f. Bakt. (2) **49**, 497, 1920.

[2]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129**, 464, 1922, Versuch 6; **142**, 195, 1923, Versuch 2.

[3]) Dieser Nährlösung wurde etwas mehr Eisenchlorid als gewöhnlich zugesetzt.

Tabelle I.

Aspergillus niger.

Dauer der Kulturen . . . Tage	10	13	20
Pilzdeckengewicht . . . . . . g	0,385	0,462	0,370
Acidität auf 10 ccm Kulturflüssigkeit n/10 $Ba(OH)_2$ . . . ccm	1,6	2,0	3,4
Farbe der Kulturflüssigkeit . .	schw. violett	ungefärbt	
Farbreaktion mit $FeCl_3 + Na_2CO_3$	die Farbe wird etwas stärker und rötlich	keine Färbung	
Oxalsäure ($H_2C_2O_4$) . . . . . . g	0,1754	0,2972	0,3313

Tabelle II.

Citromyces glaber.

Dauer der Kulturen . . . Tage	6	8	13	20
Pilzdeckengewicht . . . . . . g	0,359	0,479	0,463	0,389
Acidität auf 10 ccm Kulturflüssigkeit n/10 $Ba(OH)_2$ . . . ccm	1,6	1,2	1,0	1,4
Farbe der Kulturflüssigkeit . .	violett	intensiv violett	schw. violett	ungefärbt
Farbreaktion mit $FeCl_3 + Na_2CO_3$	kirschrot	intensiv kirschrot	schw. rötlich	keine Färb.
Oxalsäure ($H_2C_2O_4$) . . . . . . g	0,0568	0,1786	0,3021	0,3281

Die die Farbreaktion mit Eisenchlorid gebenden Phenolderivate häuften sich also anfangs in den Kulturen von *Aspergillus niger* und *Citromyces glaber* an und, nachdem ihre Menge einen maximalen Wert erreicht hatte, nahmen sie nach und nach ab und verschwanden schließlich vollständig, während die Oxalsäure beständig zunahm.

Da die mit derselben Nährlösung aufgestellte Kultur von *Aspergillus oryzae* sich bei Zimmertemperatur sehr langsam entwickelte, wurde sie in den Thermostaten mit einer Temperatur von etwa 25° verlegt. Nach zwei Tagen bildete sich bei dieser Temperatur eine starke Pilzdecke, und in der Kulturflüssigkeit erschien eine violette Farbe. Etwas später wurde die Flüssigkeit dunkelkirschrot gefärbt, und diese Farbe erhielt sich auch weiter. Die Hemmung des Verbrauches der die Farbe gebenden Phenolderivate in der Kultur von *Aspergillus oryzae* ließ sich demjenigen Umstand zuschreiben, daß dieser Pilz eine stark alkalische Reaktion in den Kulturen auf den Salzen der organischen Säuren hervorbringt[1]). In der Tat reagierte die Flüssigkeit der langdauernden Kultur auch im gegebenen Falle stark alkalisch und enthielt reichlich Carbonate, was sich durch starkes Aufbrausen bei Ansäuerung erwies. Dieselben Verhältnisse sind auch dem *Penicillium glaucum* eigentümlich, und in seinen Kulturen auf chinasaurem Natrium läßt sich auch eine langdauernde Erhaltung der an Phenolderivate geknüpften Farbe nachweisen[2]). — Aus der mit H_2SO_4 an-

[1]) *Wl. Butkewitsch*, diese Zeitschr. **129**, 464, 1922, Versuche 7 und 8.

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst, S. 470 und 471, Versuch 6.

gesäuerten Flüssigkeit der Kultur von *Aspergillus oryzae* ließ sich eine kristallinische Substanz mit den Eigenschaften der *Protocatechusäure* durch Extraktion mit Äther und Abdampfen des Ätherextrakts ausscheiden.

Was die Kultur von *Mucor racemosus* anlangt, so entwickelte dieser sich weder bei Zimmertemperatur von 17 bis 18° noch im Thermostaten bei etwa 25°. Eine Entwicklung ließ sich auch dann nicht nachweisen, wenn die in der Nährlösung befindliche Chinasäure fast vollständig mit Natriumcarbonat neutralisiert worden war. Daß die Fähigkeit, auf Chinasäure und ihren Salzen zu entwickeln, dem *Mucor racemosus* ganz abgeht, hat auch *Ritter* festgestellt[1]).

In Anbetracht der Unfähigkeit von *Mucor racemosus*, auf Chinasäure zu wachsen, ist es auffallend, daß die auf Zuckerlösung aufgezogene Decke dieses Pilzes bei ihrer Einwirkung auf Chinasäure keine Bildung der die Farbreaktion mit Eisenchlorid gebenden Phenolderivate hervorbringt und sich auch dadurch von *Aspergillus*- und *Citromyces*decken unterscheidet. Hier läßt sich also ein gewisser Zusammenhang zwischen den Fähigkeiten, einerseits die Chinasäure als eine Kohlenstoffquelle zu verbrauchen, und andererseits ihre Verwandlung in Phenolderivate hervorzubringen, nachweisen. Außerdem ließ sich die Fähigkeit zur letzteren Verwandlung nur bei denjenigen Pilzen auffinden, welche imstande sind, die Citronensäure aus Zucker zu bilden[2]), und daraus entsteht natürlich die Frage, ob diese Vorgänge betreffs der für sie maßgebenden Faktoren in irgendwelcher Beziehung zueinander stehen.

Die soeben betrachteten Verhältnisse lassen sich im weiter unten angeführten Vergleichsversuch mit *Aspergillus niger* und *Mucor racemosus* verfolgen.

Versuchsreihe 5.

Einwirkung der Pilzdecken von Aspergillus niger und Mucor racemosus auf Chinasäure und Rohrzucker.

Die Pilzdecken wurden auf der Nährlösung aufgezogen, die 7,5 Proz. Rohrzucker, 0,5 Proz. NH_4NO_3 und 0,2 Proz. Salze (mit Zn) enthielt. Mit dieser Lösung wurden je zwei Kulturen von *Aspergillus niger* und *Mucor racemosus* bei Zimmertemperatur von etwa 20° aufgestellt. Jede Kultur enthielt je 25 ccm Nährlösung. Nachdem die Pilzdecken sich genügend stark entwickelt hatten, wurden die Kulturflüssigkeiten abgegossen und die Pilzdecken wiederholt mit sterilisiertem Wasser abgespült. Jeder Decke wurden je 25 ccm in einem Falle 4proz. Chinasäure, die durch Na_2CO_3

---

[1]) *G. Ritter*, Die Materialien zur Physiologie der Schimmelpilze 1916, S. 50 (russisch).

[2]) Durch besondere, noch nicht veröffentlichte Versuche haben wir festgestellt, daß auch *Aspergillus oryzae* fähig ist, Citronensäure in den Kulturen auf Zucker zu bilden.

neutralisiert wurde und etwas $FeCl_3$ enthielt, und in einem anderen Falle 5proz. Rohrzuckerlösung zugesetzt. Diese Lösungen mit den Pilzdecken wurden bei einer Temperatur von etwa 20° stehengelassen.

In der Lösung von chinasaurem Natrium mit der *Aspergillus*-decke erschien bald eine violette Farbe, die, anfangs sich verstärkend, nach Violettrot umschlug und darauf allmählich verschwand. Dieselbe Lösung mit *Mucor racemosus* wies gar keine Veränderung auf und gab keine Farbreaktion auch bei Zusatz von $FeCl_3$ und Na_2CO_3. Zum Schluß des Versuches war die Reaktion der Lösungen in beiden Fällen neutral (auf Lackmus). — Die Flüssigkeit von *Aspergillus niger* enthielt viel Oxalsäure, die in der Lösung mit *Mucor racemosus* gar nicht vorhanden war.

Die Rohrzuckerlösung mit der *Aspergillus*decke reagierte nach 3 bis 4 Tagen sauer und gab eine ganz deutliche Reaktion von *Denigés* auf Citronensäure. Dieselbe Lösung mit der *Mucor*decke reagierte neutral (auf Lackmus) und enthielt keine Spur von Citronensäure, hatte aber den deutlichen Geruch nach Alkohol, der sich durch die Jodoformreaktion mit Jod und Kalilauge leicht nachweisen ließ. In der Lösung mit *Aspergillus niger* fiel diese Reaktion ganz negativ aus.

Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

	Aspergillus niger	*Mucor racemosus*
Versuch mit Na-Chinatlösung.		
Farbveränderungen in der Lösung . .	Violette Farbe, die, sich verstärkend, violettrot wird und darauf allmählich verschwindet	keine Färbung
Reaktion der Lösung (auf Lackmus) .	neutral	neutral
Oxalsäure	viel	nicht vorhanden
Versuch mit Rohrzuckerlösung.		
Reaktion der Lösung (auf Lackmus) .	sauer	fast neutral
Reaktion von *Denigés* auf Citronensäure	ganz deutlich	negativ
Jodoformreaktion auf Alkohol mit J und KOH	negativ	ganz deutlich

Während des Versuches wies das Mycel von *Aspergillus niger* einen deutlichen Zuwachs sowohl auf Zucker als auch auf Chinasäure auf. Beim Versuche mit *Mucor racemosus* fand ein bemerkbarer Mycelzuwachs nur auf Zucker statt, auf Chinasäure (Natriumchinat) ließ sich gar keine Veränderung im Mycel auffinden, d. h. auch im vorliegenden Falle erwies sich *Mucor racemosus* unfähig, die Chinasäure als Kohlenstoffquelle zu verbrauchen.

Nach den oben vorgebrachten Beobachtungen wird die Anhäufung der Phenolderivate bei Einwirkung der Pilzdecken auf Chinasäure

durch alkalische Reaktion begünstigt. In den weiter unten angeführten Versuchen mit *Aspergillus niger* gelang es aber, die intermediäre Anhäufung dieser Derivate auch in den Kulturen auf freier Chinasäure mit voller Sicherheit festzustellen. Gleichfalls bewährte sich dabei eine ganz deutlich ausgeprägte Beeinflussung des in Betracht stehenden Vorganges durch Zinksulfat.

Versuchsreihe 6.

Kulturen von Aspergillus niger auf Chinasäure mit und ohne Zinksulfat.

Bei dieser Versuchsreihe kamen vier Nährlösungen zur Anwendung:

a) Chinasäure . . . . 6 Proz.
NH_4-Phosphat[1]) . . . . 1 „
Salze (ohne Zn) . . . . 0,1 „
Dasselbe wie in a) und außerdem
b) $ZnSO_4$ . . . . 0,005 Proz.
c) „ . . . . 0,020 „
d) „ . . . . 0,100 „

Mit jeder Lösung wurden je zwei Kulturen von *Aspergillus niger* aufgestellt und jede Kultur enthielt je 30 ccm Nährlösung. Alle Kulturen wurden im Thermostaten bei etwa 26° stehengelassen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Dauer der Kulturen	Nährlösung	Pilzdeckengewicht g	Acidität[2]) auf 10 ccm Kulturflüssigkeit n/10 NaOH ccm	Kirschrote Färbung mit $FeCl_3$ und Na_2CO_3	Entwicklung der Conidien
3 Tage	a) ohne Zn	0,2305	26,0	ziemlich stark	bedeutend
	b) $ZnSO_4$ 0,005 Proz.	0,2595	22,4	sehr stark	schwach
	c) „ 0,02 „	0,2490	24,0	stark	noch schwächer
	d) „ 0,1 „	0	—	—	—
8 Tage	a) ohne Zn	0,4580	13,4	0	reichlich
	b) $ZnSO_4$ 0,005 Proz.	0,4410	12,8	0	
	c) „ 0,02 „	0,4190	12,6	0	
	d) „ 0,1 „	0,1620	32,0	schwach	nicht vorhanden
15 Tage	d) „ 0,1 „	0,2695	12,4	0	reichlich

Alle Kulturflüssigkeiten, welche die Farbreaktion mit Eisenchlorid und Soda gaben, reduzierten auch ammoniakalische Silbernitratlösung in der Kälte. Die Reaktion auf Oxalsäure fiel überall negativ aus.

[1]) Dabei wendete man die Lösung von saurem Ammoniumphosphat an, die mit Ammoniak neutralisiert worden war.

[2]) Beim Titrieren der ursprünglichen Nährlösung brauchte man 33 ccm n/10 NaOH auf 10 ccm. Dieser Wert ist mit den in der Tabelle angegebenen Werten nicht ganz vergleichbar, da die Verdunstung der Kulturflüssigkeit während des Versuchs bei der Bestimmung der Acidität nicht in Betracht gezogen wurde. Sie wurde direkt in der Kulturflüssigkeit bestimmt, ohne diese auf ihr ursprüngliches Volumen zu bringen.

In kleinen Mengen von 0,005 bis 0,02 Proz. zugesetzt, beschleunigte Zinksulfat anfangs etwas die Entwicklung des Pilzes und verstärkte dabei entsprechend auch die Anhäufung der die Farbreaktion mit Eisenchlorid gebenden Phenolverbindungen. Hier erwies sich also wiederum ein Zusammenhang zwischen der Bildung dieser Verbindungen und der Pilzentwicklung. Bei höherem Zinkgehalt (0,1 Proz.) wurde die Entwicklung der Pilzdecke ebenso wie die Anhäufung der Phenole stark verzögert. Aus diesem Versuche ergibt sich ganz klar, daß die betreffenden Verbindungen sich nur intermediär bilden und anhäufen; später werden sie verzehrt, und in den älteren Kulturen läßt sich keine Spur von ihnen nachweisen.

Durch die vorliegenden Versuche wird also festgestellt, daß die Verwandlung der Chinasäure unter Bildung von Benzolderivaten einen Vorgang darstellt, der nicht nur gewissen Bakterien, sondern auch vielen Pilzen eigentümlich ist, und diese Verwandlung scheint stets die Entwicklung der letzteren auf Chinasäure zu begleiten. Diese Tatsachen sprechen zugunsten der Annahme, daß der betreffende Vorgang auch in höheren Pflanzen stattfindet, in denen die Chinasäure bekanntlich ziemlich weit verbreitet ist und meistens vergesellschaftet mit Protocatechusäure, Brenzcatechin, Hydrochinon und anderen Benzolderivaten vorkommt[1]).

Von den Versuchen mit den Pilzkulturen ausgehend, kann man Protocatechusäure und wahrscheinlich Brenzcatechin für die häufigsten Produkte des Chinasäureumsatzes annehmen und den Vorgang nach dem folgenden Schema darstellen:

CH.OH / HO.HC — CH.OH / H_2C — CH_2 / HO.C.COOH
Chinasäure [2])

$\xrightarrow[-3H_2O]{+O}$

C.OH / HC — C.OH / HC — CH / C.COOH
Protocatechusäure

$\xrightarrow{-CO_2}$

C.OH / HC — C.OH / HC — CH / CH
Brenzcatechin

Es ist aber auch die Möglichkeit der unmittelbaren Bildung des Brenzcatechins aus der Chinasäure nicht ausgeschlossen, d. h.

$$\underset{\textit{Chinasäure}}{C_6H_7(OH)_4.COOH} \left\{ \begin{array}{c} +O-3H_2O-CO_2 \\ \text{oder} \\ -2H_2O-HCOOH \end{array} \right\} \longrightarrow \underset{\textit{Brenzcatechin}}{C_6H_4(OH)_2}$$

---

[1]) Vgl. *F. Czapek*, Biochem. d. Pflanzen, 2. Aufl., **3**, 1921; *W. Küster*, Biochemie, Berichte über die ges. Physiol. **1**, 99 (1920), 1923.

[2]) Nach *Emde* ist die Chinasäure Hexahydro-1,3,4,5-tetraoxybenzoesäure (COOH — 1). *Derselbe*, Apotheker-Ztg. **30**, 247, 1915; **32**, 601, 1917; zitiert nach *F. Czapek*, Biochem. d. Pflanzen, 2. Aufl., **3**, 486, 1921.

Als ein Argument zugunsten des ersteren Schemas lassen sich noch die von *Baumann* und seinen Mitarbeitern festgestellten Tatsachen ansehen, daß die durch dieses Schema vorausgesetzte Entstehung des Brenzcatechins aus der Protocatechusäure sich im Tierkörper und unter Einwirkung des Pankreasferments geltend macht[1]).

Es liegt eine gewisse Veranlassung zu der Annahme vor, daß die Umwandlung der Chinasäure unter Einwirkung der Pilze sich nicht bloß auf die soeben betrachtete Gelegenheit beschränkt, sondern auch andere Richtungen einnehmen kann. So sprechen einige der oben angegebenen Beobachtungen für die Bildung von Hydrochinon und Chinon, die sich auf folgende Weise formulieren läßt.

$$\underset{\textit{Chinasäure}}{C_6H_7(OH)_4.COOH} \left\{\begin{matrix} +O-3H_2O-CO_2 \\ \text{oder} \\ -2H_2O-HCOOH \end{matrix}\right\} \longrightarrow \underset{\textit{Hydrochinon}}{C_6H_4\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}} \xrightarrow[-H_2O]{+O} \underset{\textit{Chinon}}{C_6H_4\begin{matrix} O \\ O \end{matrix}}$$

Das Hydrochinon trifft man auch in höheren Pflanzen nicht selten mit der Chinasäure vergesellschaftet an, und das Miteinandervorkommen dieser Verbindungen läßt auch hier genetische Beziehungen zwischen ihnen voraussetzen.

Unter den übrigen in den Pflanzen vorkommenden Benzolverbindungen steht vielleicht auch die Benzoesäure mit der Chinasäure im Zusammenhang. Die Bildung von Benzoesäure aus Chinasäure im tierischen Organismus ist schon längst festgestellt worden[2]). Es ist zu bemerken, daß bei dieser Überführung gleichzeitig mit Dehydration auch eine Reduktion zur Geltung kommt.

$$C_6H_7(OH)_4.COOH + 2H - 4H_2O \longrightarrow C_6H_5.COOH.$$

Die Zusammenstellung dieser Reaktion mit den oben angegebenen legt die Vermutung nahe, daß die Oxydations- und Reduktionsvorgänge bei den biochemischen Umwandlungen der Chinasäure auch als gekoppelte Reaktionen ohne Teilnahme des Sauerstoffs und Wasserstoffs von außen vielleicht verlaufen können. So läßt sich z. B. die gleichzeitige Bildung von Protocatechusäure und Benzoesäure auf diesem Wege voraussetzen.

$$2C_6H_7(OH)_4.COOH - 6H_2O \longrightarrow C_6H_3(OH)_2.COOH + C_6H_5.COOH.$$

[1]) *E. Baumann* und *Herter*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, **244**, **1878**; *E. Baumann* und *Preusse*, ebendaselbst **8**, 156, 1878; *Preusse*, ebendaselbst **2**, 329, 1878; **4**, 209, 1880.

[2]) Bei Herbivoren kann die Chinasäure als eine Quelle der Hippursäure bildung dienen. *Loew*, Journ. f. prakt. Chem. **20**, 476, 1879; *Stadelmann*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **10**, 317, 1879.

Die Mannigfaltigkeit der unter der Einwirkung der Pilze aus Chinasäure entstehenden Produkte kann sich noch dadurch vermehren, daß den Pilzen auch die Fähigkeit zuzukommen scheint, neue Hydroxylgruppen in den Benzolring einzusetzen. Nach den Beobachtungen *Watermans*[1]) können z. B. Salicylsäure $\left(C_6H_4\begin{matrix}COOH\\OH\end{matrix}\right)$ in Glutisinsäure $\left(HO\,C_6H_3\begin{matrix}COOH\\OH\end{matrix}\right)$ und wahrscheinlich in Brenzcatechincarbonsäure $\left(C_6H_3\begin{matrix}COOH\\OH\\OH\end{matrix}\right)$ und Orthotoluylsäure $\left(C_6H_4\begin{matrix}COOH\\CH_3\end{matrix}\right)$ und Orthophthalsäure $\left(C_6H_4\begin{matrix}COOH\\COOH\end{matrix}\right)$ in entsprechende Brenzcatechinderivate unter Einwirkung von *Penicillium glaucum* umgewandelt werden. Auch die von *Raciborski*[2]) in den Pilzkulturen mit Tyrosin und Phenylalanin beobachteten Erscheinungen geben eine Veranlassung zu der Annahme, daß der Benzolring der aus diesen Aminosäuren entstehenden Produkte durch die Pilze hydroxyliert werden kann. Bekanntlich sind derartige Oxydationsreaktionen unter Überführung von Benzolen in Phenole auch im Tierkörper festgestellt worden[3]).

Die Anhäufung der Oxalsäure in den Pilzkulturen auf Chinasäuresalzen legt die Vermutung nahe, daß die sich dabei intermediär bildenden Phenolderivate als Zwischenstufe der zur Oxalsäure führenden Vorgänge fungieren. Wenn das der Fall ist, so muß hier eine oxydative Aufspaltung des Benzolringes zur Geltung kommen, ähnlich der von *Jaffe*[4]) im Tierkörper beobachteten Ringspaltung unter dem Übergang von Benzol zu Muconsäure, der sich auf folgende Weise zum Ausdruck bringen läßt:

$$\begin{matrix} & CH & \\ HC & & CH \\ HC & & CH \\ & CH & \end{matrix} + 2\,O_2 \longrightarrow \begin{matrix} CH:CH.COOH \\ | \\ CH:CH.COOH \end{matrix}$$

Muconsäure

---

[1]) *H. J. Waterman*, Centralbl. f. Bakt. (2) **42**, 639, 1915.

[2]) *M. Raciborski*, Bull. Akad. sc. Cracovie, cl. d. sc. math. et phys. **1906**, 733.

[3]) *M. Nencki* und *P. Giacosa*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **4**, 325, 1880. Eine Hydroxylierung des Benzolrings kommt auch bei der Bildung von Homogentisinsäure aus Phenylalanin und Tyrosin im Tierkörper zur Geltung. Vgl. *E. Abderhalden*, Lehrbuch der physiol. Chemie, 5. Aufl., **1**, 562 und 604, 1923.

[4]) *M. Jaffe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**, 58, 1909. Vgl. auch *M. Hensel* und *O. Riesser*, ebendaselbst **88**, 38, 1913; *Fuchs* und *A. v. Soos*, ebendaselbst **98**, 11, 1916, und *Y. Mori*, Journ. of biol. Chem. **35**, 341, 1918.

Stellt man sich vor, daß der Vorgang in derselben Richtung weiter verläuft, so kommt man gerade zur Oxalsäure. Auf derartigem oxydativen Wege ist auch eine Überführung von Phenolen, z. B. Brenzcatechin, in Oxalsäure leicht verständlich.

$$\text{Brenzcatechin} + 5O_2 \longrightarrow 3\ \text{mol. Oxalsäure}$$

Brenzcatechin — *3 mol. Oxalsäure*

In diesem Zusammenhange ist das Verhalten des aus Benzol mit Ozon entstehenden Triozonids, das durch Wasser unter Bildung von Glyoxal zersetzt wird[1]), von Interesse.

$$\text{Triozonid} + 3H_2O \longrightarrow 3\ \begin{array}{l}HC:O\\ |\\ HC:O\end{array}$$

Triozonid — *Glyoxal*

Bekanntlich gelingt es, Benzole und besonders ihre Derivate, wie Phenole, Chinone, Oxychinone, Phenolcarbonsäuren, auf chemischem Wege durch Oxydation ziemlich leicht in Fettkörper unter Aufspaltung des Benzolringes umzuwandeln. Nach *Döbner* können die Säuren, wie Meso-wein- und Maleinsäure, aus Phenol und Benzol unter Einwirkung von Kaliumpermanganat bzw. Kaliumchlorat entstehen[2]). Nach ***Willstätter*** und *Sonnenfeld* wird Tetrahydrobenzol unter katalytischer Einwirkung von Osmium durch Sauerstoffgas über Moloxy und ihm isomeren Aldehyd zu Adipinsäure oxydiert[3]).

$$\text{Tetrahydrobenzol} \xrightarrow{+O_2} \text{Moloxyd} \longrightarrow \text{Dialdehyd} \xrightarrow{+O_2} \text{Adipinsäure}$$

Tetrahydrobenzol — *Adipinsäure*

Die physiologische Aufspaltung des Kohlenstoffringes der Polyphenole und Polyoxyhydrobenzole läßt sich vielleicht auch durch die der Saccharinumlagerung ähnliche Verschiebung von Sauerstoffatomen der Hydroxyl-

[1]) *C. Harries*, Liebigs Ann. d. Chem. **343**, 335, 1906. *Derselbe*, Einwirkung von Ozon auf organische Verbindungen. Berlin 1916.

[2]) *J. Schmidt*, Lehrb. d. organ. Chemie, 1906, S. 324.

[3]) *R. Willstätter* und *E. Sonnenfeld*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **46**, 1952, 1913. — Es soll hier noch erwähnt werden, daß Quercit bei der Oxydation Schleimsäure liefert. Vgl. *F. Czapek*, Bioch. d. Pflanzen **3**, 446, 1921.

gruppen geltend machen, wobei Di- bzw. Monocarbonsäuren entstehen können.

```
  C.OH          CH
 //\COH        //\COOH         /\CH.OH        /\COOH
 |  ||    -->  |  |      bzw. |  |      -->  |  |
 \\/COH        \\/COOH         \/CH.OH        \/CH3
  COH           CH
```

Durch die oben erörterten Umwandlungen der Chinasäure verwirklicht sich vor allem ein Übergang von gesättigten Cyclohexanverbindungen zu Benzolderivaten, und es läßt sich voraussetzen, daß die ähnlichen Umwandlungen auch an anderen in den Pflanzen vorkommenden Oxyhydrobenzolverbindungen, wie Inosit, Quercit usw., zur Geltung kommen können.

Von besonderem Interesse ist der im Pflanzenreich als Ester der Orthophosphorsäure sehr weit verbreitete Inosit, der hier, wie man das überhaupt anzunehmen pflegt, aus Hexosen durch die Schließung ihrer Kohlenstoffkette zu entstehen scheint. Wenn das in der Tat der Fall ist und wenn der Inosit denselben Umwandlungen unter Bildung von Benzolderivaten in Pflanzenzellen unterliegt, die der Chinasäure bei den Pilzen eigentümlich sind[1]), so soll dieses Hexaoxyhydrobenzol eine wichtige Rolle als ein Zwischenglied beim Übergang von Kohlehydraten zu Benzolverbindungen in den Pflanzen spielen.

Da die auf diesem Wege entstehenden Phenolderivate, wie sich aus den Versuchen mit den Pilzen ergibt, unter Ringsprengung bis zu Oxalsäure und Kohlendioxyd oxydiert werden können, so ist anzunehmen, daß es sich hier um eine eigentümliche, über Hydrobenzol- und Benzolderivate verlaufende Umwandlung von Kohlehydraten handeln kann, die sich zum Teil, mindestens im Falle der weitgehenden Oxydation, als Atmungsvorgang einer besonderen Richtung anerkennen läßt.

Nimmt man zudem die bei den Benzolderivaten scharf ausgeprägte und mannigfaltig zum Vorschein kommende Reaktionsfähigkeit in Betracht, nämlich die leichte Substituierbarkeit der Wasserstoffe im Benzolring und starke Neigung zu Kondensationen der Ringe und zu Hydrierungen und Oxydationen, die durch Aufsprengung der Ringe begleitet werden können[2]), so ergibt sich klar, daß die betreffenden Derivate einen wichtigen Anteil an der physiologischen Bildung von verschiedenen Kohlenstoffverbindungen mit verschieden angeordneten

[1]) Ich hoffe bald Gelegenheit zu haben, auch die Versuche mit Inosit anzustellen. — Für Bakterien wirkt Inosit, nach *G. Meillere*, Soc. biol. **62**, 1096, 1907, als guter Nährstoff.

[2]) Die betreffenden Literaturangaben vgl. bei *R. Pummerer*, Org. Chem., Wissensch. Forschungsber., Naturw. Reihe **8**, 1921.

Kohlenstoffketten nehmen müssen. Es liegt die Möglichkeit nahe, daß die kompliziert gebauten Kohlenstoffketten nicht nur von zyklischer, sondern auch von aliphatischer Natur gerade auf diesem Wege in der lebenden Zelle entstehen[1]).

Was das oben erwähnte, bei den Pilzen an den Tag kommende Verhältnis zwischen der Fähigkeit, auf Chinasäure zu wachsen und diese in Benzolderivate zu verwandeln, einerseits, und der Fähigkeit, Citronensäure aus Zucker zu bilden, andererseits anlangt, so findet es vielleicht seinen Grund darin, daß die Überführung von Hexosen in Citronensäure durch die intermediäre Entstehung einer zyklischen Verbindung begleitet wird, die sich ihrer chemischen Konstitution nach der Chinasäure nähert. Die Bildung einer solchen Verbindung kann auf dem Wege der inneren Aldolkondensation im Zuckermolekül zur Geltung kommen, und der Vorgang der Citronensäurebildung läßt sich dann nach dem folgenden Schema zum Ausdruck bringen:

```
HOHC——CHOH          HOHC——CHOH             HOHC——CHOH
 |     |      ——>    |      |     ——>        |      |
HOC   CHOH         HOHC    CHOH   −H2O      H2C    CH2
     /                 \   /                   \   /
 CHOH                   C.OH                    C.OH
  |                     |                       |
 CH2OH                 CH2OH                   COOH
Hexose.

              HOOC   COOH
 +3O            |     |
 ——>          H2O    CH2
 −H2O             \  /
                  C.OH
                   |
                  COOH
              Citronensäure.
```

---

[1]) Vielleicht können sich auch die Fettsäuren auf demselben Wege unter entsprechender Kondensation und Aufspaltung der Benzol- bzw. Hydrobenzolringe bilden. Nach *Ciamician* und *Ravenna* wird Benzoesäure, in lebenden Mais injiziert, unter Spaltung des Ringes zu Ameisen-, Essig- und Propionsäure verarbeitet. *G. Ciamician* und *Ravenna*, Atti Acc. Leuc. Rom. (5) **27**, 2, 293, 1918; zitiert nach *F. Czapek*, Biochem. d. Pflanzen, 2. Aufl., **3**, 126, 1921. — *C. Neuberg* und *B. Arinstein*, diese Zeitschr. **117**, 269, 1921, stellten bei ihren Untersuchungen über die Buttersäuregärung fest, daß die Brenztraubensäure oder ihr Aldol als Zwischenstufe an der Überführung von Zucker in Buttersäure teilnimmt und daß auch die höheren Homologen der Buttersäure auf demselben Wege entstehen können. Ob diese Bildungsweise allgemeine Gültigkeit auch für die komplizierter gebauten Fettsäuren hat, steht noch dahin. — In diesem Zusammenhange verdient die noch von *E. Drechsel* (Journ. f. prakt. Chem. **38**, 65, 1888), festgestellte Tatsache Beachtung, daß bei Einwirkung von Wechselströmen auf Phenol Hydrierung unter Bildung von Hydrophenoketon, $C_6H_{10}O$, und Aufspaltung unter Bildung von Capronsäure und anderen Säuren stattfindet.

Nach diesem Schema soll ein Cyklopentenderivat durch Aldolschließung der Kohlenstoffkette entstehen; ebenso wie Cyklopentenaldehyd, nach *Willstätter* und *Sonnenfeld*, als Hauptprodukt beim Oxydieren des Cyklohexen durch Sauerstoffgas in Gegenwart von Osmiumschwarz aus intermediär sich bildendem Adipinaldehyd entsteht[1]).

$$\begin{array}{l} CH_2-CH_2 \\ | \\ CH_2-COH \end{array}\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\begin{array}{l}\diagdown \\ \\ \end{array} CH_2-COH \xrightarrow[-H_2O]{} \begin{array}{l} CH_2-CH_2 \\ | \\ CH_2-CH \end{array}\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\begin{array}{l}\diagdown \\ \\ \!/\!\!/ \end{array} CH-COH.$$

Die Nachprüfung der Gültigkeit des angegebenen Schemas macht die nächste Aufgabe unserer weiteren Untersuchungen aus.

Zusammenfassung.

Bei der Entwicklung der Pilze auf Chinasäure macht sich stets eine Umwandlung derselben in Benzolderivate geltend; die häufigsten Produkte dieser Umwandlung scheinen die Protocatechusäure und wahrscheinlich Brenzcatechin zu sein.

Es liegt eine gewisse Veranlassung vor, anzunehmen, daß auch Hydrochinon und Chinon sich dabei mindestens manchmal bilden.

In den Pilzkulturen auf Chinasäure ließen sich in gewissen Fällen auch schwer in Wasser lösliche, gefärbte Stoffe nachweisen, die offenbar die Kondensationsprodukte der oben genannten Benzolderivate darstellen.

Eine ähnliche Umwandlung unter Bildung derselben Produkte kam auch bei Einwirkung der auf Zucker aufgezogenen Pilzdecken auf Chinasäurelösung zur Geltung.

Die Benzolderivate, welche die für Protocatechusäure und Brenzcatechin charakteristischen Reaktionen geben, häufen sich in den Pilzkulturen nur intermediär an; in den älteren Kulturen verschwinden sie vollständig; also werden sie durch den Pilz verzehrt.

Da die sich in den Pilzkulturen auf Chinasäuresalzen reichlich anhäufende Oxalsäure dauernd in den Kulturen anwächst, so läßt sich annehmen, daß die intermediär auftretenden Benzolderivate als Zwischenglieder in dem zur Bildung dieser Säure führenden Vorgang fungieren.

Die Abwesenheit der Oxalsäure in den Pilzkulturen auf freier Chinasäure muß ihre Erläuterung darin finden, daß hier die Oxalsäure, sich intermediär bildend, weiter bis zu Kohlendioxyd oxydiert wird.

[1]) *R. Willstätter* und *E. Sonnenfeld*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 2952, 1913. — Die Kondensation des Adipinaldehyds zum Cyklopentenaldehyd wurde zuerst von *A. v. Baeyer* und *H. v. Liebig*, ebendaselbst 31, 2106, 1898, beobachtet. Vgl. auch *A. Wohl* und *H. Schweitzer*, ebendaselbst 39, 896, 1906; *C. Harries* und *H. v. Splava-Neymann*, ebendaselbst 41, 3557, 1908. — Über Aldolkondensation unter Bildung sechsgliederiger Kohlenstoffringe. Vgl. *H. Euler*, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie 1, 116—117, 1908.

Die vorliegende Umwandlung der Chinasäure durch die Pilze über Benzolverbindungen bis zu Oxalsäure und Kohlendioxyd läßt sich als ein Atmungsvorgang besonderer Richtung betrachten.

Da die in den höheren Pflanzen ziemlich weit verbreitete Chinasäure in denselben meistens als vergesellschaftet mit Protocatechusäure, Brenzcatechin, Hydrochinon und anderen Benzolderivaten vorkommt, liegt die Vermutung nahe, daß diese Derivate auch hier in genetischer Beziehung zu der Chinasäure stehen, aus welcher sie sich auf demselben Wege wie bei den Pilzen bilden.

Wahrscheinlich wandeln sich auch andere, in den Pflanzen weit verbreitete Hexahydrobenzolderivate, wie Inosit, Querzit usw., unter Bildung der Benzolverbindungen auf ähnliche Weise wie Chinasäure um und, wenn diese Oxyhydrobenzolderivate von Hexosen durch Schließung ihrer Kohlenstoffkette stammen, wie man das für Inosit anzunehmen pflegt, so müssen sie als Zwischenglieder bei Überführung von Kohlehydraten in Benzolverbindungen in den lebenden Zellen anerkannt werden.

Ihrer stark ausgeprägten Reaktionsfähigkeit gemäß können die Benzolderivate eine wichtige Rolle bei der Bildung von verschiedenen Kohlenstoffverbindungen mit kompliziert angeordneten Kohlenstoffketten in den lebenden Zellen spielen.

Nur diejenigen Pilze scheinen imstande zu sein, die Chinasäure als Kohlenstoffquelle zu verbrauchen, die fähig sind, diese Säure in die obengenannten Phenolderivate zu verwandeln. Dem auf Zucker aufgezogenen Mycel von *Mucor racemosus* geht diese Fähigkeit, die den Mycelen von *Aspergillaceae* zukommt, ganz ab, und demgemäß entwickelt sich dieser Pilz auf Chinasäure und ihren Salzen gar nicht.

Ein Zusammenhang zwischen der Pilzentwicklung auf Chinasäure und der Bildung von Benzolderivaten aus derselben kommt auch daraus zum Vorschein, daß diese beiden Vorgänge in derselben Richtung durch Zinksulfat beeinflußt werden.

Alle bisher geprüften Pilze, die sich fähig erwiesen, auf Chinasäure zu wachsen und diese in die Phenolverbindungen zu verwandeln, gehören gleichzeitig zu denjenigen, die fähig sind, Citronensäure aus Zucker zu bilden. Daraus entsteht die Frage, ob diese Fähigkeiten in irgendwelcher tatsächlichen Beziehung zueinander stehen.

Die bei unseren Versuchen festgestellten Tatsachen sprechen nicht zugunsten der von *Kostytschew*[1]) vor kurzem ausgesprochenen Anschauung, daß die Chinasäure bei Entwicklung der Pilze auf derselben vorläufig in Zucker umgewandelt und nur in Gestalt dieses letzteren verbraucht wird.

---

[1]) *S. Kostytschew*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 111, 236, 1920, und Journ. d. Russisch. bot. Ges. 6, 1, 1921.

Über die Aktivierung stickstoffhaltiger Kohlen durch Eisen.

Von

Otto Warburg und Walter Brefeld.

(Eingegangen am 9. Januar 1924.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die vorliegende Arbeit[1]) erbringt den Nachweis, daß die Oxydation der Aminosäuren an Blutkohle eine Eisenkatalyse ist, und bestätigt damit die früher gegebene Theroie des Kohlemodells[2]).

Einteilung.

I. Vorbemerkung über das Kohlemodell.

Die Oxydation der Aminosäuren an Blutkohle ist unvollständig. Cystin liefert Kohlensäure, Ammoniak und Schwefelsäure, jedoch nur 20 Proz. Kohlensäure, 30 Proz. Ammoniak und 10 Proz. Schwefelsäure der bei totaler Verbrennung entstehenden Mengen, und nimmt nur 30 Proz. des für totale Verbrennung berechneten Sauerstoffs auf. Leucin verbraucht 17 Proz. des für totale Verbrennung berechneten Sauerstoffs und liefert 17 Proz. Kohlensäure und 74 Proz. Ammoniak.

[1]) Zur Ausführung dieser Arbeit wurden uns Mittel aus der Hoshi-Stiftung zur Verfügung gestellt. Dem Japanausschuß der deutschen Notgemeinschaft sprechen wir auch hier unseren Dank aus.

[2]) *O. Warburg*, Physikalische Chemie der Zellatmung, diese Zeitschr. **119**, 134, 1921.

Bei der Oxydation des Leucins an Blutkohle entsteht, wie bei der Oxydation des Leucins durch Wasserstoffsuperoxyd[1]), Valeraldehyd, dessen Geruch sich bald nach dem Mischen von Leucinlösungen mit Kohle bemerkbar macht. Valeraldehyd seinerseits oxydiert sich weiter an Blutkohle.

Aminosäuren, in denen die Aminogruppe an ein tertiäres Kohlenstoffatom gebunden ist, werden an Blutkohle sehr viel langsamer oxydiert als primäre und sekundäre Aminosäuren[2]). Es ist bemerkenswert, daß tertiäre Aminosäuren auch von Wasserstoffsuperoxyd[2]) sehr viel langsamer angegriffen werden als primäre und sekundäre.

II. Maß der katalytischen Wirkung.

Zur Prüfung unserer Kohlepräparate benutzen wir Leucin, und zwar *Kahlbaum*sche d, l-Isobutylaminoessigsäure, die aus heißem Wasser umkristallisiert wird. In 10 ccm einer n/20 (0,65 proz.) Leucinlösung tragen wir — je nach der Wirksamkeit der Kohlepräparate — 20 bis 400 mg Kohle ein, sättigen mit atmosphärischer Luft und schütteln bei 38° im Thermostaten. Die Druckänderung am angeschlossenen Barcıoftmanometer, die von 20 zu 20 Minuten eine Stunde lang abgelesen wird, ergibt, da ein Einsatz mit Alkali die Kohlensäure absorbiert, die Geschwindigkeit der Oxydation. Hierbei sind die Kohlemengen und die Versuchszeiten so gewählt, daß sich die Leucinkonzentration weder durch die Adsorption noch durch den chemischen Umsatz erheblich ändert. Was beobachtet wird, ist also die Wirkung von Kohle, die im Gleichgewicht steht mit einer *ungefähr* n/20 Leucinlösung und mit Sauerstoff vom Drucke feuchter atmosphärischer Luft.

Den beobachteten Sauerstoffverbrauch reduzieren wir auf die Gewichtseinheit Kohle und die Zeiteinheit, indem wir als Einheiten das Kubikmillimeter Sauerstoff, das Milligramm Kohle und die Stunde benutzen. Wir bilden also den Quotienten

$$\frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Kohle} \times \text{Stunden}},$$

bezeichnen ihn mit Q und messen durch ihn die katalytische Wirksamkeit unserer Kohlepräparate.

III. Vergleich des Adsorptionsvermögens.

In eine n/20 Leucinlösung tragen wir so viel Kohle ein, daß eine 2proz. Kohlesuspension entsteht, schütteln 5 Minuten bei etwa 10°

---

[1]) Über den Abbau von Aminosäuren durch Wasserstoffsuperoxyd vgl. *C. Neuberg*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 238, 1902; diese Zeitschr. 20, 531, 1909; *Dakin*, Journ. of biol. Chem. 4, 63, 1909.

[2]) *E. Negelein*, diese Zeitschr. 142, 493, 1923.

und ermitteln die aus der Lösung durch Adsorption herausgenommene Leucinmenge titrimetrisch nach *Sörensen*[1]). Die Zeit von 5 Minuten genügt zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes und ist andererseits so kurz, daß der chemische Umsatz die Adsorptionsmessung nicht stört.

Die prozentische Abnahme des Leucintiters gibt einen für unsere Zwecke ausreichenden Maßstab des Adsorptionsvermögens, doch muß man bedenken, daß diese Abnahmen nicht im Verhältnis der Adsorptionskonstanten stehen, weil die Endkonzentrationen an Leucin nicht gleich sind.

IV. Der Ausgangspunkt der Untersuchung.

Wir tragen in 100 ccm einer n/20 Leucinlösung 2 g Blutkohle ein und messen die Adsorption des Leucins durch Formoltitration. Wir wiederholen den Versuch mit dem Unterschiede, daß wir der Leucinlösung $^1/_{2000}$ bis $^1/_{20000}$ Mol Blausäure pro Liter zusetzen und finden, daß in beiden Fällen die gleiche Menge Leucin adsorbiert wird. Gleichwohl hemmt Blausäure die Oxydation des Leucins, und zwar n/2000 Blausäure fast vollständig.

Titrieren wir bei dem Versuche nicht nur das Leucin, sondern auch die Blausäure — was mit Silbernitrat sehr genau möglich ist —, so erhalten wir ein Bild von den an der Oberfläche herrschenden Verhältnissen im Zustande der Blausäurehemmung. Wir erfahren, daß 1 Mol. Blausäure, neben 1000 Mol. Leucin an der Kohle adsorbiert, die Oxydation des Leucins merklich verlangsamt, 1 Mol. Blausäure, neben 100 Mol. Leucin an der Kohle adsorbiert, die Oxydation des Leucins fast vollständig hemmt.

Dieser einfache Versuch[2]) erlaubt den wichtigen Schluß, daß nur ein kleiner Teil der Kohleoberfläche katalytisch wirksam ist. Denn indem Blausäure einen kleinen Teil der Kohleoberfläche bedeckt, inaktiviert sie die gesamte Oberfläche. Leucin, an dem Hauptteil der Oberfläche adsorbiert, ist gegenüber Sauerstoff beständig, ein Resultat, das unwiderleglich erscheint und das den Gang unserer Untersuchung bestimmt hat. Wir haben uns gesagt, daß die Oberfläche der Blutkohle aus einer adsorbierenden Grundsubstanz besteht, die katalytisch unwirksam ist, und aus einer in sie eingelagerten Substanz, die katalytisch wirksam ist, und haben uns zunächst die Aufgabe gestellt, einen derartigen Katalysator — eine „künstliche Blutkohle" — aus einheitlichen Stoffen in übersichtlichen Schritten aufzubauen.

---

[1]) *S. P. L. Sörensen*, diese Zeitschr. **7**, 45, 1908.
[2]) *O. Warburg*, Über die antikatalytische Wirkung der Blausäure, diese Zeitschr. **136**, 266, 1923.

V. Zuckerkohle.

Nach dem Gesagten kann ein homogenes, in allen Teilen gleichartiges Adsorbens nicht die Eigenschaften der Blutkohle besitzen. Ein homogenes Adsorbens erhält man, wenn man reinen Rohrzucker unter Zusatz von Kaliumcarbonat in einen glühenden Tiegel einträgt, etwa eine Stunde lang erhitzt und dann mit Salzsäure und Wasser extrahiert.

Zuckerkohle, auf die beschriebene Art hergestellt, nimmt bei der Adsorptionsprobe 17 Proz. des Leucins aus der Lösung heraus, Blutkohle unter sonst gleichen Bedingungen 30 Proz. Zuckerkohle adsorbiert also recht gut, wenn auch schlechter als Blutkohle.

Zuckerkohle ist autoxydabel und aktiviert molekularen Sauerstoff. Da Aminosäuren von aktiviertem Sauerstoff leicht angegriffen werden, so überträgt Zuckerkohle auf die an ihrer Oberfläche adsorbierten Aminosäuren Sauerstoff. Hierbei erscheint in der umgebenden Flüssigkeit Wasserstoffsuperoxyd, ein Reaktionsprodukt, das bei der Oxydation der Aminosäuren durch Blutkohle nicht oder wenigstens nicht in nachweisbaren Mengen auftritt. Die katalytische Wirksamkeit der Zuckerkohle ist geringer als die der Blutkohle, aber von derselben Größenordnung.

Die katalytische Wirksamkeit der Zuckerkohle wird durch chemisch indifferente Stoffe — Alkohole, Urethane — gehemmt, um so stärker, je stärker diese Stoffe adsorbiert werden. Gegen chemisch indifferente Stoffe also verhält sich die Zuckerkohle wie Blutkohle oder auch wie die lebendige Substanz, und wollte man nur das Zusammenspiel unspezifischer Oberflächenkräfte und *irgendwelcher* chemischer Kräfte nachahmen, wie es der lebendigen Substanz eigentümlich ist, so wäre das System Zuckerkohle-Aminosäure ein brauchbares Modell. Mit Sauerstoff gesättigte Zuckerkohle mag man sich vorstellen als eine peroxydartige Verbindung des Kohlenstoffs, an die die Aminosäuren durch Oberflächenkräfte angelagert und von der sie durch chemisch indifferente Stoffe verdrängt werden.

Doch fehlt hier die spezifische Reaktion auf Blausäure. Eine n/1000 Blausäure, die Blutkohle sowohl als auch die lebendige Substanz inaktiviert, läßt die Wirksamkeit der Zuckerkohle intakt. Wir müssen daraus schließen, daß die in der Zuckerkohle wirkenden chemischen Kräfte anderer Art sind als die in der Blutkohle oder der lebendigen Substanz wirkenden.

VI. Silicatzuckerkohle.

Würde der Kohlenstoff der Blutkohle, wie der Kohlenstoff der Zuckerkohle, katalytisch wirken, so wäre, was auch sonst noch an der Blutkohle vor sich gehen mag, die Wirkung der Blausäure unverständlich.

Denn immer müßte ein durch Blausäure nicht hemmbarer Rest, eben die katalytische Wirkung des Kohlenstoffs, übrigbleiben. Da dies nicht geschieht, so ist zu untersuchen, wodurch sich der Kohlenstoff der Blutkohle von dem Kohlenstoff der Zuckerkohle unterscheidet.

Es liegt nahe, hier an die anorganischen Stoffe zu denken, die die Technik bei der Verkohlung des Blutes zusetzt, in erster Linie an Kieselsäure, von der *Merck*sche Blutkohle etwa 10 Proz. enthält. In der Tat, setzt man dem Zucker bei der Verkohlung neben Kaliumcarbonat noch Kaliumsilicat zu und verfährt weiter, wie bei der Darstellung der silicatfreien Zuckerkohle, so erhält man eine kieselsäurehaltige Kohle, die die interessante und von uns gesuchte Eigenschaft besitzt, *Aminosäuren zwar zu adsorbieren, jedoch nicht katalytisch zu wirken. Leucin, an der Oberfläche dieser Kohle adsorbiert, ist gegenüber Sauerstoff beständig.*

Silicatzuckerkohle nimmt bei der Adsorptionsprobe 16 Proz. Leucin aus der Lösung heraus, Zuckerkohle 17 Proz., Blutkohle 30 Proz. Silicatzuckerkohle adsorbiert also schlechter als Blutkohle, aber ebensogut wie Zuckerkohle.

Warum unter der Einwirkung des Silicats katalytisch unwirksamer Kohlenstoff entsteht, können wir nicht erklären. Zunächst glaubten wir, in der Silicatkohle sei der Kohlenstoff durch eine Kieselsäurehaut geschützt. Doch war diese Annahme unrichtig, denn durch Abrauchen mit Flußsäure auf dem Wasserbade kann die Kieselsäure aus der Kohle entfernt werden, ohne daß sich die Eigenschaften des Kohlenstoffs ändern, insbesondere ohne daß er katalytisch wirksam wird.

Die Gewinnung der gut absorbierenden, katalytisch unwirksamen Kohle war ein wesentlicher Schritt auf dem Wege zur Darstellung der künstlichen Blutkohle. Denn es war offenbar, daß wir hier die Grundsubstanz der Blutkohle in Händen hatten, die zu aktivieren nunmehr unsere weitere Aufgabe war.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 1.

VII. Aktivierung der Silicatzuckerkohle.

Daß die katalytisch wirksame Substanz der Blutkohle nur in kleinen Mengen in der Blutkohle enthalten ist, folgt aus dem Blausäureversuch, den wir an die Spitze des Ganzen gestellt haben. Sucht man nach einer derartigen Substanz, so richtet sich die Aufmerksamkeit auf das Eisen, das, aus dem Blutfarbstoff stammend, ein nie fehlender Bestandteil der Blutkohle ist. Seine Menge beträgt einige Milligramm pro Gramm Kohle. Bedenkt man, daß Eisen in vielen einfachen chemischen Systemen Oxydationen katalysiert, ferner, daß Blausäure leicht mit Eisen reagiert, so gewinnt der Gedanke, die katalytisch wirksame Substanz der Blutkohle sei eine Eisenverbindung, an Wahr-

scheinlichkeit. Gegen ihn spricht in keiner Weise die Tatsache, daß freie Eisenionen ohne Wirkung auf gelöste Aminosäuren sind. Denn die chemischen Wirkungen der Elemente sind verschieden je nach der Form, in der sie vorliegen.

Setzt man bei der Darstellung der Silicatzuckerkohle Eisensalz zu, so findet sich, daß die eisenhaltigen Kohlen katalytisch ebenso wirksam sind, wie die eisenfreien Kohlen. Das Eisen in derartigen Kohlen ist durch Salzsäure nur zum Teil extrahierbar und liegt in ihnen wahrscheinlich als Eisensilicat vor.

Wendet man andererseits das Silicatverfahren auf getrocknetes Blut an, so erhält man immer wirksame Kohlen von den Eigenschaften der technischen Blutkohlen. Man sieht daraus, daß nicht irgend ein unbekanntes technisches Verfahren die gesuchten Eigenschaften hervorbringt, sondern Bestandteile des Blutes, und gibt man, trotz der geschilderten negativen Versuche mit Eisensalz, den Gedanken an das Eisen nicht auf, so ist zu überlegen, in welcher Form das Eisen im Blute vorliegt.

Träger des Bluteisens ist der Blutfarbstoff, aus dem eine kristallisierte Pyrroleisenverbindung, das *Nencki*sche Hämin, gewonnen werden kann. Hämin besitzt die Zusammensetzung $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$ und enthält 8,5 Proz. Eisen. Setzt man bei der Bereitung der Silicatzuckerkohle eine kleine Menge Hämin zu, so erhält man in der Tat *Kohlen von der katalytischen Wirksamkeit der Blutkohle*, die außerdem die Eigenschaft der Blutkohle besitzen, durch kleine Mengen Blausäure inaktiviert zu werden. Damit war die Aufgabe, eine „künstliche Blutkohle" aufzubauen, gelöst.

Eine graphische Darstellung mag die wichtigen Versuche veranschaulichen. In den Abb. 1 und 2 bedeuten die Abszissen die Versuchszeiten t in Minuten, die Ordinaten die zur Zeit t auf Leucin übertragenen Sauerstoffmengen in Kubikmillimetern. Für jeden dargestellten Versuch wurde die gleiche Menge Kohle, nämlich 200 mg, und die gleiche Menge n/20 Leucinlösung, nämlich 10 ccm, verwendet.

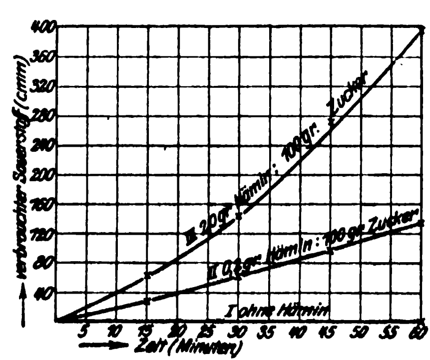


Abb. 1. Je 200 mg Silicatzuckerkohle + 10 ccm n/20 Leucinlösung. 38°. Gasraum Luft.

Abb. 1 zeigt das Verhalten der Silicatzuckerkohlen. Die Kurve der ohne Hämin hergestellten Kohle (Kurve I) verläuft auf der Abszissenaxe, zu keiner Zeit ist ein Verbrauch an Sauerstoff wahrnehmbar. Setzt man bei der Darstellung der Kohle auf 100 g Rohrzucker 0,2 *g Hämin* zu,

so ist die entstehende Kohle (Kurve II) fast von der katalytischen Wirksamkeit der *Merck*schen Blutkohle, ihr Wirkungsquotient ist 0,7 gegenüber 1,0 für *Merck*sche Blutkohle. Ein Zusatz *von 2 g Hämin* zu 100 g Rohrzucker bewirkt (Kurve III), daß die entstehende Kohle etwa dreimal wirksamer ist als technische Blutkohle.

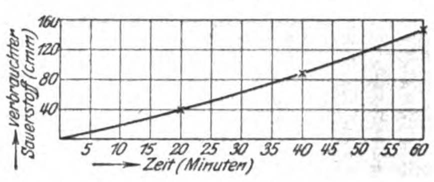


Abb. 2. 200 mg *Merck*sche Blutkohle + 10 ccm n/20 Leucinlösung. 38°. Gasraum Luft.

Abb. 2 zeigt das Verhalten der *Merck*schen Blutkohle. Sie ist im gleichen Maßstab gezeichnet wie Abb. 1, so daß die für gleiche Zeiten ausgezogenen Ordinaten beider Abbildungen im Verhältnis der Wirkungsquotienten stehen.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 2.

VIII. Häminkohle.

Die Aktivierung durch Hämin wächst mit steigenden Häminmengen, und zwar nicht proportional dem zugesetzten Hämin, sondern langsamer. Die wirksamsten Kohlen, die man mit Hilfe von Hämin erhält sind Kohlen aus reinem Hämin.

Häminkohle stellen wir her durch Eintragen von Hämin in einen glühenden Porzellantiegel. Wir extrahieren dann mit heißer Salzsäure und wiederholen das Glühen. Der größte Teil des Hämineisens wird hierbei zu metallischem Eisen reduziert und geht bei der Extraktion mit Salzsäure aus der Kohle heraus. Es bleibt, mit einer Ausbeute von etwa 30 Proz. des Hämingewichtes, eine Kohle, die neben Kohlenstoff einige Prozente Stickstoff und einige Prozente Eisen enthält.

Häminkohle ist katalytisch sieben- bis zehnmal wirksamer als technische Blutkohle. Gleichwohl adsorbiert sie außerordentlich schlecht, bei der Adsorptionsprobe nimmt sie nur 1 bis 2 Proz. des Leucins aus der Lösung heraus, während Blutkohle 30 Proz. herausnimmt. Häminkohle verhält sich also umgekehrt wie Silicatzuckerkohle. Silicatzuckerkohle adsorbiert gut und wirkt nicht, Häminkohle adsorbiert kaum und wirkt sehr stark. Auf adsorbiertes Leucin umgerechnet, ist Häminkohle 100- bis 300mal wirksamer als technische Blutkohle.

Fügen wir hinzu, daß Häminkohle durch n/1000 Blausäure inaktiviert wird, so ist der Blausäureversuch, von dem wir ausgingen, vollkommen durchsichtig. Da der Katalysator nur in kleiner Menge in der Grundsubstanz der Blutkohle enthalten ist und außerdem rund 20mal schlechter adsorbiert als die Grundsubstanz, so inaktiviert Blausäure die Blutkohle ohne nachweisbare Wirkung auf die Adsorption.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 3.

IX. Kohlen aus Anilinfarbstoffen.

Wir haben bisher die Frage, worauf die große katalytische Wirksamkeit der Häminkohle beruht, offen gelassen. Um sie zu entscheiden, haben wir uns zunächst die Aufgabe gestellt, *andere* Stoffe zu finden, die Kohlen von der Wirksamkeit der Häminkohle liefern. Hierbei brauchten wir auf die geringe katalytische Wirksamkeit des autoxydabeln Kohlenstoffs keine Rücksicht zu nehmen, da sie im Vergleich zur Wirksamkeit der Häminkohle klein ist. Wirkt doch Häminkohle etwa 30mal stärker als autoxydabler Kohlenstoff, und auf die adsorbierten Leucinmengen umgerechnet, 500mal stärker. So war es nicht mehr notwendig, mit Silicat zu verkohlen, sondern die zu prüfenden Stoffe wurden einfach als solche oder mit etwas Kaliumcarbonat im Tiegel geglüht.

Unter den Substanzen, die bei diesem Verfahren Kohlen liefern — alle flüchtigen Substanzen scheiden natürlich aus —, sind zwei Klassen zu unterscheiden, solche, deren Kohlen stickstoffhaltig sind, und solche, deren Kohlen es nicht sind. *Nur die ersteren sind katalytisch wirksam.* Reich an Stickstoff und besonders wirksam sind Kohlen aus gewissen Anilinfarbstoffen, wie Indulinen, Safraninen und komplizierteren Azokörpern. Aus käuflichen Farbstoffpräparaten hergestellt, sind diese Kohlen sogar noch wirksamer als Häminkohle und besitzen wie die Häminkohle die Eigenschaft, durch n/1000 Blausäure inaktiviert zu werden.

Einige Zahlen sind in Tabelle I zusammengestellt. In der ersten Spalte steht der Name der Substanz, aus der die Kohle hergestellt wurde, in der zweiten der Stickstoffgehalt der Kohle, in der dritten der Wirkungsquotient Q, in der letzten Spalte der Eisengehalt der Kohlen.

Tabelle I.

Kohle aus	N-Gehalt der Kohle Proz.	Wirkungsquotient Q[1]	Fe-Gehalt der Kohle Proz.
Hämin	3,0	7—10	2,5
Indulin *Grübler* . .	7,1	13,4	0,19
Safranin ,, . .	10,2	18,2	0,13
Neutralrot ,, . .	10,2	13,6	0,10
Bismarckbraun *Grübler*	10,0	13,8	0,15

Was den Eisengehalt der Kohlen anbetrifft, so stammt das Eisen der Häminkohle aus dem Häminmolekül, das Eisen der übrigen Kohlen aus Verunreinigungen der technischen Farbstoffpräparate. Man erkennt aus der Tabelle, daß eine Vermehrung des Eisengehaltes von einigen

[1]) Q für technische Blutkohle ist etwa gleich 1.

Zehntel Prozenten auf einige Prozente jedenfalls keine Vermehrung der Wirkung bedingt, daß es sich also, wenn überhaupt das Eisen für die Wirkung wesentlich ist, um Mengen handelt, die um $^1/_{10}$ Proz. oder darunter liegen.

Während es schwer ist, aus Hämin eisenfreies Hämatoporphyrin zu gewinnen, ist es verhältnismäßig leicht, Anilinfarbstoffe herzustellen, deren Eisengehalt sehr klein ist. Wir beschränkten uns auf Versuche mit Bismarckbraun, dem am leichtesten zugänglichen Farbstoff der Tabelle, und untersuchten, ob Kohle aus Bismarckbraun, wenn man von einem reineren Farbstoff ausgeht, weniger wirksam ist als Kohle aus technischem Bismarckbraun.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 4.

X. Aktivierung durch Eisen.

Um eisenarmes Bismarckbraun herzustellen, fällen wir, wenn die Diazotierung des m-Phenylendiamins beendigt ist, den Farbstoff nicht nach der technischen Vorschrift mit Natriumchlorid aus, sondern durch Einleiten von Salzsäure. Auf diese Weise gewinnen wir Bismarckbraun, dessen Eisengehalt von der Größenordnung $^1/_{100}$ mg pro Gramm ist, und daraus Kohlen, deren Eisengehalt von der Größenordnung $^1/_{10}$ mg pro Gramm ist. Es findet sich, daß diese Kohlen erheblich unwirksamer sind als die aus dem technischen Bismarckbraun hergestellten Kohlen und, was entscheidend ist, *daß wir mit Hilfe von Eisensalz die eisenarmen Kohlen aktivieren können.* Dazu genügt es, die Kohle mit wenig Eisenchlorid zu tränken, zu glühen und mit Salzsäure zu extrahieren.

Einige Zahlenbeispiele sind in Tabelle II zusammengestellt. Wir erkennen aus ihnen, daß ein Anstieg des Eisengehaltes von der Größenordnung 0,01 Proz. auf 0,1 Proz. einen Anstieg der katalytischen Wirkung auf das Acht- bis Zehnfache bedingt, wobei die katalytische Wirkung langsamer ansteigt als der Eisengehalt. Die Ausschläge sind sehr groß und beweisen unwiderleglich, daß Eisen imstande ist, aus wässeriger Lösung adsorbierte Aminosäuren katalytisch zu oxydieren. Eine graphische Darstellung des wichtigen Aktivierungsversuches findet man in Abb. 3 des folgenden Abschnittes.

Der Vorgang der Aktivierung durch Eisensalz vollzieht sich in zwei Phasen. Erhitzt man die Kohle kurze Zeit mit Eisensalz auf schwache Rotglut, so ist ein Teil des Eisens so weit säurefest gebunden, daß es bei einstündigem Erwärmen mit n-Salzsäure auf dem Wasserbade nicht extrahierbar ist. Doch genügt dies nicht, damit das Eisen katalytisch wirke. Erst bei weiterem und sehr starkem Glühen erfolgt die Aktivierung des Eisens.

Tabelle II.

Versuch	Kohle	Eisengehalt der Kohle Proz.	Katalytische Wirksamkeit Q[1])
1	*vor* Eisenzusatz	0,008	0,8
	nach ,,	0,25	20
2	*vor* ,,	0,009	2,4
	nach ,,	0,2	20
3	*vor* ,,	0,006	1,9
	nach ,,	0,13	16,0

Ist der Eisengehalt der Kohle auf einige Zehntel Prozent gebracht worden, so kann durch weiteren Eisenzusatz die Wirkung nicht mehr gesteigert werden. Es spielt also die *Verdünnung des Eisens* in dem festen Körper eine merkwürdige Rolle, die an das Verhalten der Schwermetalle in den *Lenard*schen Phosphoren erinnert[2]).

Stickstoff*freie* Kohlen können in ähnlicher Weise durch Eisen nicht aktiviert werden. Glüht man stickstofffreie Kohlen mit Eisensalz und kocht dann mit Salzsäure, so geht das gesamte Eisen aus der Kohle wieder heraus, und die geringen Wirkungen, die man erzielt[3]), wenn nach dem Glühen die Kohle mit Salzsäure nicht extrahiert wird, hängen wahrscheinlich irgendwie mit der Selbstoxydation des reduzierten Eisens zusammen.

Unter diesen Umständen liegt der Schluß nahe, das Eisen in den stickstoffhaltigen Kohlen sei an den Stickstoff gebunden. Wir wollen diesen Schluß ziehen, uns also vorstellen, die katalytisch wirksame Eisenverbindung sei eine Verbindung von Eisen, Stickstoff und Kohlenstoff, in der das Eisen an den Stickstoff gekettet ist. — Bemerkenswerterweise ist hier das Eisen nicht durch beliebige Schwermetalle vertretbar, weder Kupfer, noch Kobalt, noch Mangan vermag stickstoffhaltige Kohlen zu aktivieren.

Kohle aus Bismarckbraun nimmt bei der Adsorptionsprobe etwa 4 Proz. Leucin aus der Lösung heraus gegenüber 30 Proz., die technische Blutkohle herausnimmt. *Dabei ist es gleichgültig, ob die Bismarckbraunkohle mit Eisen aktiviert ist oder nicht.* Auch hier zeigt sich,

[1]) *Q* für technische Blutkohle ist etwa gleich 1.

[2]) Nach *Ph. Ellinger* (*Hoppe-Seyler*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **123**, 246, 1922) übertragen *Lenard*sche Phosphore auf Aminosäuren in ähnlicher Weise Sauerstoff wie Blutkohle. Es ist uns nicht gelungen, die *Ellinger*schen Beobachtungen zu wiederholen. Wir möchten deshalb den Wunsch aussprechen, daß *Ellinger* die in der angezogenen Mitteilung veröffentlichten Versuche nachprüft.

[3]) *O. Warburg*, diese Zeitschr. **119**, 150, 1921.

daß ein Zusammenhang zwischen der Adsorption, die wir messen, und der katalytischen Wirkung nicht besteht.

Mit Eisen aktivierte Bismarckbraunkohle ist katalytisch 20mal wirksamer als technische Blutkohle und, auf die adsorbierten Leucinmengen umgerechnet, 160mal wirksamer.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 5.

XI. Hemmung der Eisenkatalyse durch Blausäure.

Die Wirkung der durch Eisen aktivierten Kohle denken wir uns aus zwei Teilwirkungen zusammengesetzt: aus der *Zunahme* der Wirkung, die das Eisen hervorbringt, und aus dem Rest, der Wirkung der nicht aktivierten Kohle. Ist auch der Rest eine Eisenkatalyse — was wahrscheinlich ist —, so ist unsere Trennung unberechtigt. Doch kommt es uns hier darauf an, einen Vorgang näher zu untersuchen, der ganz unzweifelhaft eine Eisenkatalyse ist, und als solchen trennen wir die *Zunahme* der Wirkung, die beim Glühen mit Eisen erfolgt, von der schon vorher vorhandenen Wirkung ab. Wird diese Zunahme durch kleine Konzentrationen von Blausäure gehemmt?

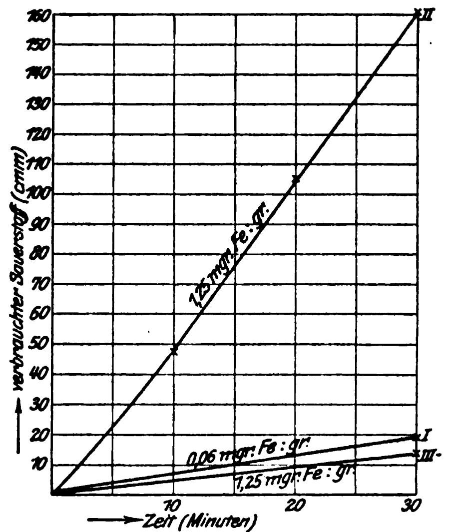


Abb. 3. Je 20 mg Kohle + 10 ccm Lösung. I: Kohle nicht aktiviert, in reiner n/20 Leucinlösung. II: Kohle, mit Eisen aktiviert, in reiner n/20 Leucinlösung. III: Kohle, mit Eisen aktiviert, in n/20 Leucin-, n/1000 Blausäurelösung.

In Abb. 3 sehen wir einen Versuch graphisch dargestellt. Als Abszissen sind die Versuchszeiten t aufgetragen, als Ordinaten die zur Zeit t auf Leucin übertragenen Sauerstoffmengen. Kurve I zeigt die Sauerstoffübertragung durch nicht aktivierte Kohle, Kurve II die Sauerstoffübertragung nach der Aktivierung, Kurve III die Sauerstoffübertragung durch aktivierte Kohle, wenn die Lösung neben $^1/_{20}$ Mol Leucin $^1/_{1000}$ Mol Blausäure enthält. *Wir erkennen, daß die ganze Wirkung des Eisens unter dem Einfluß der Blausäure verschwindet.* Dieser Versuch bildet den Schluß der ganzen Untersuchung, er beweist, daß die Wirkung der Blausäure eine Wirkung auf das Eisen der Kohle ist.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 5.

XII. Reaktionsfähigkeit des Eisens.

Wir betrachten wiederum nur die *Zunahme* der Wirkung, die bei der Aktivierung durch Eisen eintritt, reduzieren diese Zunahme auf die Gewichtseinheit *zugesetzten* Eisens und erhalten so ein Maß für die Reaktionsfähigkeit des an die Kohle gebundenen Eisens. Aus Versuch 3 der Tabelle II ergibt sich, daß 1 mg Eisen, der Kohle zugesetzt, pro Stunde 11000 cmm Sauerstoff auf Leucin überträgt oder 1 Atom Eisen pro Stunde 27 Mol. Sauerstoff. Nehmen wir an, daß der Primärvorgang in der Reaktion *eines* Atoms Eisen mit *einem* Molekül Sauerstoff besteht, so reagiert in etwa *2 Minuten* jedes Eisenatom einmal mit Sauerstoff. Es sei erwähnt, daß Eisen in der komplexen Cysteinverbindung noch erheblich reaktionsfähiger ist[1]), indem hier, wenn wir dieselbe Annahme über den Primärvorgang machen, jedes Eisenatom in *12 Sekunden* einmal mit Sauerstoff reagiert.

Unsere Rechnung ergibt nur einen Minimalwert für die Reaktionsfähigkeit des an Kohle gebundenen Eisens, denn sie beruht auf der Voraussetzung, das bei der Aktivierung gebundene Eisen werde beim Glühen quantitativ in die katalytisch wirksame Form übergeführt. Gerade dies aber ist wenig wahrscheinlich, vielmehr vermuten wir, daß sich beim Glühen ein Gleichgewicht zwischen wirksamer und unwirksamer Form einstellt, und daß die Menge an wirksamem Eisen im Vergleich zur Gesamtmenge des Eisens immer klein ist.

XIII. Bau der technischen Blutkohle.

Nach dem, was wir in den vorhergehenden Abschnitten erfahren haben, ist es nunmehr leicht, sich ein Bild von der Entstehung und dem Bau der technischen Blutkohle, soweit er für uns von Interesse ist, zu machen.

Der Katalysator der Blutkohle ist Eisen, gebunden an Stickstoff, wobei es nicht notwendig ist, daß der gesamte eisenbindende Stickstoff aus dem Hämin stammt. An dem Beispiel der aus Anilinfarbstoffen hergestellten Kohlen haben wir gesehen, daß Stickstoff verschiedener Herkunft imstande ist, Eisen in eine katalytisch wirksame Form überzuführen.

Die Grundsubstanz der Blutkohle ist Kohlenstoff, durch Behandlung mit Kieselsäure katalytisch unwirksam gemacht.

Vor der inaktivierenden Wirkung der Kieselsäure bleibt die katalytisch wirksame Eisenverbindung verschont. Daß dies so ist, beweist das Verhalten der Häminkohle, die durch Kieselsäure nicht inaktiviert werden kann. Warum es so ist, bleibe dahingestellt.

---

[1]) *O. Warburg* und *Seishi Sakuma*, Arch. f. d. ges. Physiol. 200, 203, 1923; diese Zeitschr. 142, 68, 1923.

XIV. Experimenteller Teil.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs benutzen wir Gefäße, wie sie in dieser Zeitschrift 142, 70, abgebildet sind. Das Volumen der Gefäße ist 30 ccm. Je 10 ccm Kohlesuspension werden in den Hauptraum, 1 ccm 5proz. Kalilauge in den Einsatz eingefüllt. Der Gasraum enthält atmosphärische Luft. Die Gefäßkonstante für Sauerstoff ist ungefähr 2, was bedeutet, daß eine Druckänderung von 1 mm einen Sauerstoffverbrauch von 2 cmm anzeigt.

Neben einem mit Wasser beschickten Gefäß — dem Thermobarometer — wird immer ein mit *Kohle und Wasser* beschicktes Gefäß eingehängt, das ebensoviel Kohle enthält wie die Versuchsgefäße. Dieses Gefäß ergibt die „Selbstoxydation“ der Kohle, eine Größe, die von dem Sauerstoffverbrauch der leucinhaltigen Kohlesuspensionen abzuziehen ist.

Die Selbstoxydation einer sachgemäß hergestellten Kohle aus Hämin oder aus Anilinfarbstoffen ist im Vergleich zur Sauerstoff*übertragung* zu vernachlässigen. Denn 1 mg Kohle, in Wasser suspendiert, verbraucht pro Stunde etwa 0,5 cmm Sauerstoff, während die gleiche Kohlemenge in der gleichen Zeit 10 bis 20 cmm Sauerstoff auf Leucin überträgt. Es sind deshalb in den Protokollen die Selbstoxydationen, die sich auf diese Kohlen beziehen, nicht gesondert angeführt, sondern die verbrauchten Sauerstoffmengen immer *abzüglich* der Selbstoxydation angegeben.

Bei Versuchen mit technischer Blutkohle und mit „künstlicher“ Blutkohle dagegen — also den katalytisch weniger wirksamen Kohlen — ist die Selbstoxydation gesondert angeführt.

1. Silicatzuckerkohle.

Darstellung: 100 g Rohrzucker, mit 15 g Kaliumcarbonat und 15 g Kaliumsilicat fein zerrieben, werden in einen glühenden Tiegel in kleinen Portionen eingetragen, wobei man jedesmal wartet, bis die Entwicklung der Dämpfe beendigt ist. Dann wird 40 Minuten lang bei bedecktem Tiegel auf Rotglut erhitzt, nach dem Erkalten mit verdünnter heißer Salzsäure gekocht, filtriert und mit heißem Wasser säurefrei gewaschen. Ausbeute 12 bis 16 g.

Adsorption der Silicatzuckerkohle: 0,6 g Kohle werden mit 30 ccm n/20 Leucinlösung geschüttelt. Nach 5 Minuten wird filtriert und im Filtrat das Leucin nach *Sörensen* titriert.

20 ccm Leucinlösung *vor* dem Schütteln mit Kohle	5,07 ccm n/5 NaOH
20 ccm Kohlefiltrat	4,24 „ n/5 „

Durch die Kohle herausgenommen 0,83 ccm n/5 NaOH oder 16 Proz. des Leucins.

38°. Gasraum Luft.

Zeit	200 mg Kohle, 10 ccm Wasser	200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin
	cmm O_2	cmm O_2
15 Min.	7	6
30 „	15	14
45 „	22	21
60 „	28	28

Sauerstoffübertragung: Es wird also in der Leucinlösung nicht *mehr* Sauerstoff verbraucht als in Wasser, d. h. kein Sauerstoff auf Leucin übertragen. Dabei ist die „Selbstoxydation" der Kohle gering, nämlich pro Milligramm Kohle und Stunde 0,14 cmm, während die Selbstoxydation der ohne Silicat hergestellten Kohle[1]) pro Milligramm Kohle und Stunde 0,5 cmm Sauerstoff beträgt.

2. Aktivierung durch Hämin.

Die Darstellung der Hämin-Silicat-Zuckerkohle geschieht wie die der Silicatzuckerkohle, mit dem Unterschied, daß dem Gemisch von Rohrzucker, Kaliumsilicat und Kaliumcarbonat vor dem Zerreiben Hämin zugesetzt wird.

Aktiviert wurde mit zwei verschiedenen Mengen Hämin, nämlich mit 0,2 g Hämin auf 100 g Rohrzucker und mit 2 g Hämin auf 100 g Rohrzucker.

Sauerstoffübertragung durch die aktivierten Kohlen:

a) Kohle aus 100 g Rohrzucker + 0,2 g Hämin. 38.° Gasraum Luft.

Zeit	1.	2.	3.	4.
	200 mg Kohle, 10 ccm Wasser	200 mg Kohle, 10 ccm n/1000 Blausäure	200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin	200 mg Kohle, 10 ccm n/1000 Blausäure, n/20 Leucin
	cmm O_2	cmm O_2	cmm O_2	cmm O_2
15 Min.	11	16	42 (31)	23 (7)
30 „	26	31	88 (62)	45 (14)
45 „	37	46	134 (97)	68 (22)
60 „	49	62	184 (135)	91 (29)

In der Tabelle sind die nicht eingeklammerten Zahlen die direkt beobachteten Sauerstoffabsorptionen. Die eingeklammerten Zahlen sind die mit Hilfe der Spalten 1 und 2 korrigierten Werte und bedeuten die Sauerstoffübertragung auf Leucin.

Der Wirkungsquotient[2]) in der reinen Leucinlösung ist $\frac{135}{200} = 0{,}68$, in der blausäurehaltigen Leucinlösung $\frac{29}{200} = 0{,}15$. Die Hemmung durch n/1000 Blausäure ist also $\frac{0{,}68 - 0{,}15}{0{,}68} = 78$ Proz.

[1]) *O. Warburg*, Über die antikatalytische Wirkung der Blausäure, diese Zeitschr. 136, 266, 1923.

[2]) Der Wirkungsquotient für *Merck*sche Blutkohle ist etwa 1,0.

b) Kohle aus 100 g Rohrzucker + 2 g Hämin. 38°. Gasraum Luft.

Zeit	1. 200 mg Kohle, 10 ccm Wasser ccm O_2	2. 200 mg Kohle, 10 ccm n/1000 Blausäure cmm O_2	3. 200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin cmm O_2	4. 200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 Blausäure cmm O_2
15 Min.	14	9	77 (63)	24 (15)
30 „	24	18	168 (144)	48 (30)
45 „	34	29	309 (275)	77 (48)
60 „	44	38	439 (395)	102 (58)

Der Wirkungsquotient in der reinen Leucinlösung ist $\frac{395}{200} = 1{,}98$, in der blausäurehaltigen Leucinlösung $\frac{58}{200} = 0{,}29$. Die Hemmung durch n/1000 Blausäure beträgt also $\frac{1{,}98 - 0{,}29}{1{,}98} = 86$ Proz.

3. Darstellung und Eigenschaften der Häminkohle.

Hämin gewinnen wir nach *Willstätter* und *Fischer*[1]). Rinderblutzellen werden durch Waschen mit 0,9proz. Kochsalzlösung von Serum befreit. 700 ccm der möglichst konzentrierten Zellsuspension, die mit Luft bis zur Sättigung geschüttelt worden ist, fließen im Laufe von 30 Minuten in 2 Liter siedenden Eisessig, der etwa 10 g Kochsalz gelöst enthält. Dann wird noch 10 Minuten zum Sieden erhitzt, im Laufe von 15 Minuten 1 Liter Wasser zugegeben und einen Tag stehengelassen. Von den Häminkristallen gießt man ab, wäscht auf der Nutsche zuerst mit 50proz. Essigsäure, dann mit Wasser und trocknet.

Zur Darstellung der *Kohle* tragen wir 2 g Hämin in kleinen Portionen in einen glühenden Porzellantiegel ein. Wir lassen die entweichenden Dämpfe sich entzünden und warten mit weiterem Zusatz von Hämin jedesmal so lange, bis keine Dämpfe mehr entweichen. Ist alles Hämin eingetragen, so glühen wir 30 Minuten in bedecktem Tiegel in der Flamme eines starken Teclubrenners, die den Tiegel von allen Seiten umgibt, extrahieren dann eine halbe Stunde mit n-Salzsäure auf dem Wasserbade und glühen nochmals eine Stunde in der Flamme des Teclubrenners. Der Tiegel soll dabei hell rotglühend werden, auf seinem Boden soll die Kohle in einer Höhe von wenigen Millimetern ausgebreitet sein.

Die Ausbeute an Kohle bei diesem Verfahren beträgt 0,65 g oder 33 Proz. des Hämingewichtes.

Zur Bestimmung des *Eisens*[2]) in der Häminkohle glühen wir etwa 200 mg im offenen Porzellantiegel, nehmen den rotbraunen Rückstand

[1]) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 458, 1913.
[2]) Vgl. *Treadwell*, Quantitative Analyse.

mit konzentrierter eisenfreier Salzsäure unter Zusatz einiger Kristalle Kaliumchlorat auf, verdampfen zur Trockne, bringen den Rückstand mit verdünnter Salzsäure auf ein Volumen von 25 ccm, tragen 0,5 g Kaliumjodid ein, lassen im Dunkeln 20 Minuten stehen und titrieren das ausgeschiedene Jod mit n/10 Thiosulfat, das aus einer in $^1/_{50}$ ccm geteilten Bürette zufließt. 1 ccm n/10 Thiosulfat = 5,6 mg Eisen.

Man findet so einen Eisengehalt von einigen Prozenten. Stickstoff bestimmen wir nach *Dumas*, wobei die Kohle sehr schwer, erst bei Weißglut, verbrennt. Beispielsweise wurden folgende Werte erhalten: aus 0,2273 g Kohle 5,9 ccm Stickstoff (18° 759 mm über 33 Proz. KOH) oder 3 Proz. Stickstoff.

Adsorption des Leucins durch Häminkohle. 30 ccm etwa n/20 Leucin werden mit 0,6 g Häminkohle geschüttelt. Titration nach *Sörensens* Formolmethode.

20 ccm Lösung vor Zusatz der Kohle 5,10 n/5 NaOH
20 ccm des Kohlefiltrats . . . . . 5,03 n/5 „

Aus der Lösung herausgenommen 0,07 ccm n/5 NaOH = 1,4 Proz.

Sauerstoffübertragung durch Häminkohle:

38°. Gasraum Luft.

Zeit	20 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin cmm O_2	20 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 HCN cmm O_2
20 Min.	54	6,4
40 „	107	12,8
60 „	159	20,0

$$\text{Wirkungsquotient } Q \text{ in reiner Leucinlösung } \left(\frac{\text{cmm}}{\text{mg} \times \text{Std.}}\right)\text{: } 8{,}0.$$

$$\text{Wirkungsquotient } Q \text{ in blausäurehaltiger Leucinlösung } \left(\frac{\text{cmm}}{\text{mg} \times \text{Std.}}\right)\text{: } 1{,}0.$$

$$\text{Hemmung durch Blausäure } \frac{159 - 20}{159} = 86 \text{ Proz.}$$

Unregelmäßigkeiten. Im allgemeinen lag der Wirkungsquotient Q der Häminkohlen zwischen 7 und 10. Doch sind im Laufe der Arbeit zwei Unregelmäßigkeiten vorgekommen, die hier mitgeteilt seien. Eine Kohle, die nach dem zweiten Glühen noch 4 Stunden lang auf dem Wasserbade mit n-Salzsäure extrahiert worden war, gab den niedrigen Wirkungsquotienten von 1. Die Stickstoffbestimmung nach *Dumas* zeigte, daß der Gehalt an Stickstoff auffallend niedrig war, nämlich nur 0,65 Proz. Es scheint also, daß langes Extrahieren mit Salzsäure schädlich ist. — Eine Kohle, für die im Juli Q gleich 8 gefunden war, erwies sich nach 3 Monaten als katalytisch unwirksam, konnte jedoch durch einstündiges Glühen wieder bis zu dem Werte 8 aktiviert werden.

4. Darstellung und Eigenschaften der Kohlen aus Anilinfarbstoffen.

Die verwendeten Farbstoffe waren von *Grübler* bezogene Präparate, das Indulin „wasserlösliches“ Indulin. Bekanntlich sind die käuflichen Farbstoffe mit großen Mengen Salz, meist Kochsalz, vermengt. Es scheint, daß ein gewisser Salzgehalt — an Kaliumchlorid oder Natriumchlorid oder Kaliumcarbonat — nicht nur nicht schadet, sondern die Entstehung einer wirksamen Kohle sogar begünstigt.

Die Darstellung der Kohlen geschah nach der für Häminkohle gegebenen Vorschrift mit dem Unterschied, daß nach dem zweiten Glühen nochmals eine halbe Stunde mit n-Salzsäure auf dem Wasserbade extrahiert wurde.

Den Eisengehalt der Kohlen bestimmten wir kolorimetrisch nach *Lachs* und *Friedenthal*[1]), den Stickstoffgehalt nach *Dumas*. Die Kohlen verbrennen sehr schwer.

In der folgenden Tabelle findet man einige Angaben über die chemische Zusammensetzung derartiger Kohlen, so weit sie für uns von Interesse ist, sowie über ihren Sauerstoffverbrauch in n/20 Leucinlösung, für zwei Kohlen, die Indulin- und die Safraninkohle, außerdem eine Messung des Sauerstoffverbrauchs in blausäurehaltiger Leucinlösung.

38°. Gasraum Luft.

Kohle aus	O_2-Verbrauch in reiner Leucinlösung cmm O_2	O_2-Verbrauch in blausäurehaltiger Leucinlösung cmm O_2	Hemmung durch Blausäure
Indulin Fe: 0,19 Proz. N: 0,0863 g gaben 5,3 ccm N bei 17° u. 755 mm Hg = 7,1 Proz.	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 134. $Q = 13{,}4$	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 Blausäure in 20′: 16. $Q = 1{,}6$	91 Proz.
Safranin Fe: 0,13 Proz. N: 0,1479 g gaben 12,9 ccm N bei 17° und 762 mm Hg = 10,2 Proz.	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 182. $Q = 18{,}2$	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 Blausäure in 20′: 26 $Q = 2{,}6$	86 Proz.
Neutralrot Fe: 0,1 Proz. N: 0,0521 g gaben 4,6 ccm N bei 17° und 757 mm Hg = 10,2 Proz.	20 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 90. $Q = 13{,}6$	nicht bestimmt	—
Bismarckbraun Fe: 0,15 Proz. N: 0,1003 g gaben 8,6 ccm N bei 15° und 755 mm Hg = 10,0 Proz.	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 138. $Q = 13{,}8$	nicht bestimmt	—

[1]) *Lachs* und *Friedenthal*, diese Zeitschr. **82**, 130, 1911.

5. Aktivierung der Bismarckbraunkohle durch Eisen.

Darstellung des Farbstoffes: 30 g Meta-Phenylendiamin werden mit 390 ccm n-Salzsäure und Wasser auf 1 Liter gebracht. Unter Kühlung mit Eis tropft man eine Lösung von 12,8 g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser hinzu, erhitzt nach beendigter Diazotierung kurze Zeit auf dem Wasserbade, kühlt mit Eis und leitet Salzsäuregas ein, bis über dem entstandenen braunen Niederschlag eine hellgelbe Lösung steht. Man saugt auf der Nutsche ab, wäscht mit verdünnter eisenfreier Salzsäure nach und trocknet zunächst über Kaliumhydroxyd im Vakuumexsikkator, später bei 120°, bis kein Geruch nach Salzsäure mehr wahrnehmbar ist. Ausbeute etwa 30 g.

Darstellung der Kohle. Wir verreiben 2 g des Farbstoffes mit 0,5 g Kaliumchlorid oder Kaliumcarbonat, tragen das Gemisch in kleinen Portionen in einen glühenden Porzellantiegel ein, wobei die entweichenden Dämpfe sich entzünden, glühen dann bei bedecktem Tiegel eine halbe Stunde, lassen abkühlen, extrahieren 30 Minuten mit n-Salzsäure auf dem Wasserbade und waschen mit heißem Wasser nach, bis die saure Reaktion verschwunden ist. Ausbeute 30 Proz. vom Gewicht des Farbstoffes.

Aktivierung der Kohle. Wir tränken 300 mg Kohle mit 1 ccm einer Eisenchloridlösung, die 1 mg Eisen im Kubinzentimeter enthält, trocknen den gut verrührten Kohlebrei auf dem Wasserbade, glühen eine Stunde in einem kleinen bedeckten Porzellantiegel, der in die Flamme eines starken Teclubrenners versenkt ist, extrahieren auf dem Wasserbade eine Stunde lang mit n-Salzsäure und waschen mit heißem Wasser säurefrei. Beim Extrahieren mit Salzsäure geht ein Teil des Eisens aus der Kohle wieder heraus, die Hälfte bis zwei Drittel des Eisens bleibt in der Kohle zurück, die nach der beschriebenen Behandlung 1½ bis 2½ mg Eisen pro Gramm enthält.

Zur Kontrolle behandeln wir 300 mg *desselben* Kohlepräparates in der gleichen Weise mit dem Unterschiede, daß wir *nicht* mit Eisen tränken. Die Kontrollkohle ist also ebenso lange und ebenso stark geglüht und ebenso mit Salzsäure und Wasser gewaschen, wie die mit Eisenchlorid getränkte Kohle. Daß der Effekt der Eisenbehandlung durch das Eisen und nicht etwa durch das Chlor des Eisenchlorids hervorgebracht wird, beweist die Tatsache, daß Kupfer- oder Kobalt- oder Manganchlorid ohne Wirkung sind, wenn wir sie in gleicher Weise mit Kohle in Reaktion treten lassen.

Wir haben sechs Versuche mit sechs verschiedenen, aus Bismarckbraun hergestellten Kohlen gemacht und immer einen großen Anstieg der katalytischen Wirkung gefunden, nämlich, nach Ausweis der folgenden Tabelle, einen Anstieg auf das 20fache (Versuch 1), auf das 8fache (Versuch 2), auf das 11fache (Versuch 3), auf das 10fache (Versuch 4),

auf das 8fache (Versuch 5) und auf das 8fache (Versuch 6). Versuch 6 ist der in Abb. 3, Abschnitt XI, graphisch dargestellte.

38°. Gasraum Luft.

Versuch	Kohle ohne Eisenzusatz		Kohle mit Eisenzusatz		
	Fe-Gehalt	Sauerstoffverbrauch in n/20 Leucinlösung	Fe-Gehalt	Sauerstoffverbrauch in n/20 Leucinlösung	Sauerstoffverbrauch in n/20 Leucin, n/1000 Blausäurelösung
1	0,008 Proz.	30 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 4,8 cmm 20′: 8,0 „	0,25 Proz.	30 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 104 cmm 20′: 196 „	—
2	—	20 mg Kohle 10 ccm Lösung 10′: 3,2 cmm 20′: 6,4 „ 30′: 11,2 „	—	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 27,2 cmm 20′: 57,5 „ 30′: 88,0 „	—
3	—	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 4,0 cmm 20′: 8,8 „ 30′: 14,4 „	0,25 Proz.	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 51,0 cmm 20′: 102,0 „ 30′: 150,4 „	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 4,1 cmm 20′: 5,8 „ 30′: 8,8 „ d. i. 94 Proz. Hemmung
4	—	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 3,2 cmm 20′: 6,4 „ 30′: 9,6 „	—	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 33,6 cmm 20′: 67,2 „ 30′: 97,6 „	—
5	0,009 Proz.	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 8,0 cmm 20′: 16,0 „	0,25 Proz.	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 69 cmm 20′: 130 „	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 3,2 cmm 20′: 5,6 „ d. i. 96 Proz. Hemmung
6	0,006 Proz.	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 6,9 cmm 20′: 11,2 „ 30′: 19,2 „	0,13 Proz.	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 48 cmm 20′: 105 „ 30′: 161 „	20 mg Kohle, 10 ccm Lösung 10′: 3,3 cmm 20′: 8,5 „ 30′. 13,9 „ d. i. 92 Proz. Hemmung

In drei Versuchen wurde der Eisengehalt der nicht aktivierten Kohle bestimmt und von der Größenordnung (vgl. Tabelle) 0,01 Proz. gefunden. In vier Versuchen wurde der Eisengehalt der aktivierten Kohle bestimmt und zu (vgl. Tabelle) 0,13 bis 0,25 Proz. gefunden.

In drei Versuchen wurde die Wirkung der n/1000 Blausäure (Versuche 3, 5 und 6 der Tabelle) auf die katalytische Wirkung der aktivierten Kohle quantitativ verfolgt und eine Hemmung von 94 Proz. (Versuch 3), von 96 Proz. (Versuch 5) und von 92 Proz. (Versuch 6)

gefunden. Versuch 6 ist der in Abb. 3, Abschnitt XI, graphisch dargestellte.

Adsorption des Leucins durch aktivierte und nicht aktivierte Kohle.

Nicht aktivierte Kohle, Eisengehalt 0,006 Proz. 0,3 g Kohle mit 15 ccm n/20 Leucinlösung geschüttelt, filtriert und nach *Sörensen* titriert.

10 ccm Leucinlösung *vor* dem Schütteln mit Kohle 2,97 ccm n/5 NaOH
10 ccm Kohlefiltrat . . . . 2,85 „ n/5 „

Aus der Lösung herausgenommen 0,12 ccm n/5 NaOH oder 4 Proz.

Aktivierte Kohle, Eisengehalt 0,25 Proz. 0,3 g Kohle mit 15 ccm n/20 Leucinlösung geschüttelt, filtriert und nach *Sörensen* titriert.

10 ccm Leucinlösung *vor* dem Schütteln mit Kohle 2,97 ccm n/5 NaOH
10 ccm Kohlefiltrat . . . . 2,85 „ n/5 „

Aus der Lösung herausgenommen 0,12 ccm n/5 NaOH oder 4 Proz.

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Zellsalze auf den intermediären Stoffwechsel der organischen Substanz.

Von

Kenji Tadenuma (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. Januar 1924.)

In drei kürzlich aus dem hiesigen Laboratorium erschienenen Arbeiten ist der Einfluß der Zellsalze auf Vorgänge in der organischen Körpersubstanz untersucht worden. Meine vorliegende Studie knüpft daran an. Der leitende Gedanke bei diesen Arbeiten war folgender: Über die Wirkung der Zellsalze, also vor allem des Kaliums, Phosphors, Eisens, Jods einschließlich des in weiterem Sinne ebenfalls ihnen zugehörigen Calciums und Magnesiums auf den Stoffwechsel und die formativen Leistungen der organischen Körpersubstanz bei Gegenwart einer hinreichenden Vitaminmenge war bisher so gut wie nichts bekannt, da alle früheren Untersuchungen über den Einfluß mehr oder weniger salzarmer Ernährung ohne Rücksicht auf das Vitaminproblem angestellt worden waren. Da nun gewisse theoretische Erwägungen dafür sprachen, daß zwischen der Vitamin- und Zellsalzwirkung auf die organische Körpersubstanz mancherlei Ähnlichkeit bestehen könnte, war es geboten, die Frage der Salzwirkung auf die Umsetzungen der organischen Substanz an Tieren zu untersuchen, die gleichzeitig mit der Nahrung genügende Vitaminmengen erhielten.

In den ersten der oben erwähnten Arbeiten hat *Jamasaki* (1) den Einfluß der Zellsalze auf die Entwicklung von Spermatozoen und Eiern bei Mäusen derart untersucht, daß er den Tieren an Stelle der Zellsalze, die die Kontrolltiere neben dem Kochsalz erhielten, eine entsprechende Kochsalzzulage gab zu derjenigen Kochsalzmenge, die sie wie die ersteren Tiere an sich schon mit dem Futter erhielten. Es war natürlich das Futter beider Tiergruppen im übrigen genau das gleiche. Das Ergebnis war, daß die männlichen zellsalzfrei ernährten Tiere eine deutliche Abnahme der Spermatozoen in den Hoden, degenerative Veränderungen an den Zellen und auch Riesenzellenbildungen erkennen ließen, und daß die ebenso ernährten weiblichen Tiere eine auffällige große Zahl atrophischer Follikel

in den Ovarien zeigten, alles natürlich im Vergleich zu den zellsalzreich ernährten Kontrolltieren.

In der zweiten der genannten Arbeiten studierte *Hirabayashi* (2) unter Vermeidung einer Überdosierung mit Kochsalz den Einfluß des Mangels einzelner Salze einschließlich des Kochsalzes auf das morphologische Verhalten der Hoden bei Mäusen und fand ähnliche Veränderungen in mehr oder minder ausgesprochenem Maße. Magnesium oder Phosphor oder Kalkmangel in der Nahrung erwiesen sich als besonders störend. Wir sehen also, daß die Salze eine Rolle bei der Zellneubildung spielen, die gerade an Zellen gezeigt werden konnte, bei denen die Neubildung in raschem Tempo verläuft. Zellsalzmangel wirkt auf die Spermatozoenbildung — das geht auch aus der Arbeit von *Jamasaki* (1) hervor — ganz ähnlich wie vollständige Nahrungskarenz, nur mit dem Unterschiede, daß im letzteren Falle Riesenzellenbildung niemals nachweisbar war.

Die dritte der eingangs erwähnten Arbeiten, nämlich diejenige von *Asada* (3), beschäftigt sich mit dem Eiweißstoffwechsel und dem Gaswechsel. Bei einem Stoffwechselversuche am Hunde fand *Asada*, daß nach einer sehr langen zellsalzfreien Periode, in der der Körper an Zellsalz verarmt war, die Zulage aller Zellsalze die entstandenen Störungen der Oxydationsverminderung und des N-Zerfalls kompensierte. Auch eine Abnahme des Körpergewichtes beobachtete *Asada* in den zellsalzfreien Perioden. Indessen ist darauf kein allzu großes Gewicht zu legen, weil mit dem Wechsel der Salzzufuhr sich leicht Veränderungen im Wassergehalt des Körpers einstellten. In seinem Versuche verglich *Asada* bei demselben Tiere und gleicher salzarmer Nahrung Perioden, in denen das Tier 3 g Zellsalz + 3 g Kochsalz als Zulage zu dieser Nahrung erhielt, mit Perioden, in denen es nur 3 g Kochsalz bekam. *Asada* hat also bei seinem Versuch nicht wie *Jamasaki* das Zellsalz bei der zellsalzfreien Nahrung dem Gewichte nach durch eine entsprechende Kochsalzzulage ersetzt, und zwar um eine Kochsalzdiurese zu vermeiden, die den Versuch hätte störend beeinflussen können[1]).

Aus den Versuchen von *Hirabayashi* ergibt sich, daß bei dem *Jamasaki*schen Versuch, die Störung, die die zellsalzfrei ernährten Tiere zeigten, nicht auf dem Plus an Kochsalz beruhte, das sie im Vergleich zu den mit Zellsalz ernährten Tieren bekamen, sondern auf dem Mangel bestimmter Salze.

Bei meinen Versuchen gab ich — die Einzelheiten der Versuchsanordnung werden später besprochen — den Tieren von der 16,66 Proz. NaCl enthaltenden Zellsalz-Kochsalzmischung entweder etwa 0,9 g pro Kilogramm Körpergewicht, also darin etwa 0,15 bis 0,2 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht, oder aber etwa 0,13 g Zellsalz-Kochsalzmischung pro Kilogramm Körpergewicht und darin also etwa 0,02 bis 0,03 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht.

---

[1]) Weitere Versuche zeigten, daß die Wirkung der Zellsalzzulage auf den N-Umsatz nur dann an der Gesamtbilanz zum Ausdruck kommt, wenn der Körper vorher an Zellsalzen verarmt war. Ist das nicht der Fall, und läßt man bei gleichbleibender NaCl-Gabe die Zellsalze einfach fort, so ändert sich bei kurzfristigen Versuchen nichts in der N-Bilanz ändert man aber gleichzeitig die NaCl-Zulage zur Nahrung, so wird die N-Bilanz und das Körpergewicht durch die NaCl-Gabe bestimmt.

Wurde die ganze Zellsalz-Kochsalzmischung durch Kochsalz ersetzt, so erhielten meine Hunde im ersten Falle etwa 0,78 bis 1,17 g Kochsalz, im zweiten Falle etwa 0,13 bis 0,18 g Kochsalz pro Kilogramm Körpergewicht. Bei den großen Salzgaben erhielten also die Tiere in der Zellsalzperiode etwa 0,17 g NaCl, in der zellsalzfreien Periode dagegen etwa 0,97 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht. Bei den kleinen Salzgaben bekamen die Tiere in der Zellsalzperiode höchstens 0,03 g NaCl, in der zellsalzfreien Periode aber etwa 0,15 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht. Einerlei, ob ich die Kochsalzgabe unter Fortlassung der Zellsalzgabe von 0,17 g auf 0,94 g oder aber von 0,03 g auf 0,15 g pro Kilogramm Körpergewicht erhöhte, d. h. einerlei, ob ich sie verfünffachte oder versechsfachte in der zellsalzfreien Periode, immer traten dieselben Veränderungen bei den Tieren auf.

Nun wissen wir aus den Arbeiten von *Straub* (4), *Gruber* (5), *Belli* (6) und anderen, daß Kochsalzmengen von etwa 0,6 bis 1,1 g pro Kilogramm Körpergewicht zu einer Erhöhung des N-Umsatzes führen. Kleinere Kochsalzmengen, wie sie mit der täglichen mundgerecht gesalzenen Nahrung eingenommen werden, wirken im Gegensatz hierzu N-sparend; noch kleinere Mengen wirken wieder den N-Umsatz fördernd. Es hätte also bei meinen Versuchen in den Fällen, in denen ich 0,9 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht gab, das Kochsalz als solches erhöhend auf den N-Umsatz wirken müssen. Das betrifft nur die Tiere mit den großen Salzzulagen von etwa 0,9 g pro Kilogramm Körpergewicht in der zellsalzfreien Periode. Die Erhöhung des N-Umsatzes wird bei diesen Dosen von den Autoren in erster Linie auf die gesteigerte Diurese bezogen. In allen anderen Fällen habe ich aber bei meinen Versuchen Kochsalzgaben entweder innerhalb der Zellsalzperiode oder in der zellsalzfreien Periode gegeben, die etwa zwischen 0,02 bis 0,18 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht lagen, die also entweder sich bei den kleinsten Dosen von 0,02 g leicht erhöhend oder indifferent dem N-Umsatz gegenüber verhalten, oder die bei den Dosen von 0,13 bis 0,18 g N-sparend gewirkt haben mußten. Trotzdem ich also bei den Tieren mit der kleinen Salzzulage in der zellsalzfreien Periode mit etwa 0,13 bis 0,18 g eine Kochsalzmenge gab, die jedenfalls nicht fördernd, sondern im Gegenteil eher hemmend auf den N-Umsatz gewirkt haben mußte, traten bei diesen Tieren prinzipiell dieselben Veränderungen im Blutchemismus auf, wie bei denjenigen Tieren, die die großen Kochsalzmengen von 0,97 g in der zellsalzfreien Periode erhalten, und bei denen diese großen Kochsalzmengen vielleicht schon fördernd den N-Umsatz beeinflußt hatten.

Da nun, wie ich hier vorwegnehmen will, am Blute in den zellsalzfreien Perioden Erscheinungen sich zeigten, die auf einen gesteigerten N-Umsatz hindeuten, und da diese Erscheinungen bei allen Tieren in der zellsalzfreien Periode nachweisbar waren, einerlei ob sie hier den N-Umsatz steigernde, oder den N-Umsatz herabsetzende NaCl-Mengen erhielten, so kann im letzteren Falle das Kochsalz dieses Phänomen kaum erzeugt haben, wofern das NaCl trotz seiner N-sparenden Wirkung nicht doch solche Veränderungen am Blutchemismus zustandebringt; anderenfalls kann es wohl nur von dem Zellsalzmangel

abhängen; im ersteren Falle muß das Zuviel oder das Zuwenig an Kochsalz im gleichen Sinne auf den N-Umsatz gewirkt haben, wie das Zuwenig an Zellsalz. Gerade der Kochsalzüberschuß und der Zellsalzmangel könnten sich also gegenseitig in ihrer gleichgerichteten, den N-Umsatz steigernden Wirkung verstärken.

Gerade bei den Tieren, die die kleinen Salzmengen erhielten, hätte in der zellsalzhaltigen Periode die geringe Kochsalzmenge von 0,03 g pro Kilogramm Körpergewicht auf den N-Umsatz eher steigernd und in der zellsalzfreien Periode die etwas größere Kochsalzmenge von 0,13 bis 0,15 g NaCl pro Kilogramm Körpergewicht N-sparend wirken müssen. In Wahrheit trat das Umgekehrte ein. Es wird dadurch bewiesen, daß das beobachtete Phänomen bei dieser Kochsalzdosierung nichts mit dem Kochsalz, sondern nur mit dem Zellsalz etwas zu tun hat.

Wenn nun in der zellsalzfreien Periode eine größere Kochsalzgabe auf den N-Umsatz gleichsinnig wirkt wie der Zellsalzmangel, dann muß auch bei meinen Tieren, die in der zellsalzfreien Periode die größeren Kochsalzmengen bekamen, das Phänomen des N-Zerfalls viel ausgesprochener sein als bei den Tieren, die in der zellsalzfreien Periode nur die kleinen Kochsalzmengen erhielten. Wie aus meinen Versuchsprotokollen hervorgeht, ist das auch tatsächlich der Fall.

In meiner Versuchsreihe 2 war bei den Tieren, die nur 1 g Salz in toto erhielten, der durchschnittliche Wert des Rest-N-Gehaltes des Blutes in der zellsalzhaltigen Periode in 100 g frischen Blutes bei beiden Tieren 39 mg, in der zellsalzfreien Periode 42,35 mg. Die Differenz zwischen beiden Perioden betrug also 3 mg. Bei den Tieren aber, die 6 g Salz in toto erhalten hatten, waren diese Werte in der zellsalzhaltigen Periode 41 bzw. 39 mg, in der zellsalzfreien Periode aber 49 bzw. 47 mg. Die Differenz betrug also hier 8 mg. Man ersieht daraus, daß der Rest-N sich in der zellsalzfreien Periode bei den Tieren mit der großen, den N-Umsatz fördernden Kochsalzgabe um das Zwei- bis Dreifache stärker vermehrt hatte als bei den Tieren, die in der zellsalzfreien Periode die kleinere, an sich N-sparende Kochsalzgabe erhalten hatten.

Das alles beweist also schon, daß auch den Zellsalzen als solchen ganz bestimmte Wirkungen auf den N-Umsatz zukommen, die nichts mit der Salzmenge als solcher, d. h. nichts mit einer allgemeinen Salzwirkung zu tun haben; und da auch *Asada*, der in seinem Versuche zwar sowohl in der zellsalzhaltigen wie in der zellsalzfreien Periode dem Hunde immer unverändert etwa 0,35 g Kochsalz pro Kilogramm Körpergewicht gab, eine Dosis reichte, die an sich wohl an der Grenze der N-sparenden Dosis stand, und da bei diesem Hunde in der zellsalzfreien Periode dennoch ein gesteigerter N-Zerfall im Vergleich zu der Zellsalzperiode auftrat, so hatte also in dem *Asada*schen Versuche der

Fortfall der Zellsalze, entweder noch verstärkend auf die in allen Perioden durch die Anwesenheit des Kochsalzes an sich schon bedingte Förderung des N-Zerfalls gewirkt, oder aber die umgekehrte Wirkung ausgeübt. Es geht also der *Asada*sche Versuch ganz konform mit meinen Versuchen, bei denen ich die größeren Kochsalzgaben den Tieren reichte.

Gruber gibt an, daß das Kochsalz ohne Einfluß auf den Energiewechsel ist. *Asada* stellte aber in seinem Versuche fest, daß Zellsalzmangel eine Herabsetzung, Zellsalzreichtum aber eine Steigerung des O_2-Verbrauches bewirkt.

Aus den bisher besprochenen Versuchen von *Jamasaki*, *Hirabayashi*, *Asada* und mir ergibt sich also, daß die Zellsalze den N-Ansatz befördern, die Zellneubildung unterstützen und den Gaswechsel steigern. Die Erhöhung des N-Zerfalls schloß *Asada* aus dem Verhalten der gesamten N-Bilanz, ich selbst erschloß sie aus der Steigerung des Rest-N im Blute, die ich durchgängig bei allen meinen Hunden in der zellsalzfreien Periode beobachtet habe. Daß sich bei kurzfristigen Versuchen die Gesamt-N-Bilanz noch nicht zu ändern braucht, wurde oben schon gesagt. Ich beschränkte mich aber nicht auf die Rest-N-Bestimmung im Blute allein, sondern bestimmte auch den Neutralfettgehalt des Blutes, den Blutzucker und die Trockensubstanz des Blutes, alles nach der *Bang*schen Methode. Doch bevor ich auf meine Versuche weiter eingehe, will ich zunächst kurz die Versuchsanordnung schildern.

Die Versuchstiere waren Hunde. Sie erhielten ein salzarmes Grundfutter mit genügendem Vitamingehalt. Das Futter bestand aus Weizeneiweiß, das von der chemischen Fabrik von Dr. Klopfer (Dresden-Leubnitz) bezogen worden war, ferner aus Reis, Rohrzucker, frischer ungesalzener Butter, Citronensaft und destilliertem Wasser. Der Reis und das Weizeneiweiß wurden mit destilliertem Wasser zu einem Brei gekocht, nach Erkalten desselben wurde die Butter und der Citronensaft mit dem Zucker zugegeben. Außerdem konnten die Tiere destilliertes Wasser nach Belieben trinken. In der ersten zellsalzhaltigen Periode bekamen die Tiere als Salzzulage zu dem Futter eine bestimmte Menge Salzgemisch, das folgende Zusammensetzung hatte: KCl 20 g, $CaCO_3$ 100 g, Magnesium citricum 25 g, Na_2HPO_4 sicc. 100 g, Ferrum citricum 5 g, $NaCl$ 50 g. In der zweiten zellsalzfreien Periode erhielten sie zum Futter eine Kochsalzmenge, die in Gramm der Zellsalzmenge der ersten Periode entsprach. Das Körpergewicht der Tiere wurde täglich bestimmt. Die Blutentnahme fand immer 20 Stunden nach der Nahrungsaufnahme statt. Der Salzgehalt der Grundnahrung, deren Menge sich bis auf einen Versuch, in dem ich die Tiere absichtlich unterernährte, genau wie die Salzgabe nach dem Körpergewicht der Tiere richtete, ist aus der Tabelle zu berechnen, die *Asada* in seiner Arbeit über die Zellsalzwirkungen auf den Stoffwechsel[1]) mitgeteilt hat. Daraus geht hervor, daß der Salzgehalt dieser Grundnahrung gegenüber den Salzmengen, die die Tiere als Zulage zu der Grundnahrung bekamen,

[1]) Diese Zeitschr. **140**, 332.

ein verschwindend geringer war. Mit einer Ausnahme war die Nahrung also bei allen Versuchen für die Tiere kalorisch suffizient. In dem einen Falle habe ich eine kalorisch insuffiziente Nahrung gegeben, um den Einfluß des Zellsalzmangels auf den Stoffwechsel bei Unterernährung verfolgen zu können.

Versuch 1.

A. Zwei Hunde, gleich schwer, etwa 6 kg Körpergewicht. Futter pro Tag und pro Tier: Weizeneiweiß 24 g, Reis 36 g, Butter 35 g, Salzgemisch 6 g, Citronensaft 60 g, Zucker 10 g, destilliertes Wasser nach Belieben.

B. Zwei Hunde, fast gleich schwer, etwa 7 kg Körpergewicht. Fütterung wie bei A., nur mit der Ausnahme, daß die Hunde der Gruppe B 6 g Kochsalz an Stelle des Salzgemisches bekamen.

Körpergewicht und Reststickstoff im Blute wurden alle 2 Tage vor der Fütterung bestimmt.

Datum	Rest-N in 100 ccm frischen Blutes mg	Körpergewicht g	Rest-N in 100 ccm frischen Blutes mg	Körpergewicht g
	Gruppe A.			
	Hund 1		Hund 2	
11. IV.	40	6 800	33	6 400
13. IV.	—	—	43	—
17. IV.	56	—	52	—
11. IV.	58	—	50	—
21. IV.	66	—	45	—
24. IV.	41	—	39	—
26. IV.	42	73 00	—	6 600
	Gruppe B.			
	Hund 3		Hund 4	
10. IV.	40	7 700	—	7 000
14. IV.	66	—	28	—
18. IV.	43	—	34	—
20. IV.	50	—	41	—
23. IV.	48	—	32	—
25. IV.	42	—	46	—
27. IV.	49	6 900	—	6820

Versuch 2.

A. Zwei Hunde. Nr. 1.: Fütterung: Weizeneiweiß 20 g, Reis 30 g, Butter 29 g, Salzgemisch 5 g, Citronensaft 50 ccm, Zucker 9 g.

Nr. 2: Weizeneiweiß 24 g, Reis 36 g, Butter 35 g, Salzgemisch 6 g, Citronensaft 60 ccm, Zucker 10 g.

B. Zwei Hunde. Nr. 3: Weizeneiweiß 30 g, Reis 52 g, Butter 51 g, Salzgemisch 1 g, Citronensaft 76 ccm, Zucker 14 g.

Nr. 4: Weizeneiweiß 20 g, Reis 30 g, Butter 29 g, Salzgemisch 1 g, Citronensaft 50 g, Zucker 9 g.

Diese Nahrung bekommen die Hunde 26 Tage. Vom 27. Tage an wird das Salzgemisch fortgelassen und der Hund Nr. 1 der Gruppe A erhält 5 g Kochsalz, der Hund Nr. 2 dagegen 6 g Kochsalz, die Hunde der Gruppe B erhalten 1 g Kochsalz mit der Nahrung.

Körpergewichtstabelle (Versuch 2) in Gramm.

Datum	Salzgemisch 6 g		Salzgemisch 1 g		Datum	Kochsalz 6 g		Kochsalz 1 g	
	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4		Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4
4. V.	5000	6200	7600	5000	1. VI.	5100	6400	7800	5500
9. V.	5120	6240	7540	5100	4. VI.	5000	6350	7500	5200
11. V.	5000	6200	7600	4900	6. VI.	5000	6200	7500	5200
13. V.	5020	6200	7600	5100	9. VI.	4800	6000	7200	5000
15. V.	5000	6240	7640	5000	11. VI.	4700	6000	7200	5000
21. V.	5000	6200	7620	5120	13. VI.	4800	6200	7200	5100
23. V.	5020	6240	7600	5140	15. VI.	4900	6200	7250	5000
28. V.	4960	6120	7500	5100	18. VI.	5000	6200	7300	5000
30. V.	5000	6200	7700	5200	20. VI.	4700	6050	7200	4800

Rest-N-Tabelle in Milligrammprozent (Versuch 2) auf frisches Blut berechnet.

Datum	Salzgemisch 6 g		Salzgemisch 1 g		Datum	Kochsalz 6 g		Kochsalz 1 g	
	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4		Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4
4. V.	39	36	38	37	1. VI.	42	43	—	40
7. V.	38	35	39	37	4. VI.	45	43	44	—
9. V.	40	38	35	38	6. VI.	53	47	45	45
11. V.	43	41	41	39	8. VI.	53	55	46	45
13. V.	41	40	39	40	11. VI.	46	48	38	40
19. V.	40	38	36	40	13. VI.	53	51	45	42
21. V.	43	39	38	42	18. VI.	51	45	39	43
23. V.	45	41	43	41	20. VI.	52	47	39	42
25. V.	42	42	40	41					
27. V.	39	40	38	40					
30. V.	39	41	40	—					

Versuch 3.

Fütterung vom 20. bis 25. Juli pro Tag: Weizeneiweiß 21 g, Reis 32 g, Butter 32 g, Citronensaft 53 ccm, Zucker 10 g, Salgzemisch 5 g.

Fütterung vom 26. Juli bis 8. August wie oben, nur mit der Ausnahme, daß der Hund 5 g Kochsalz erhält.

Datum	Rest-N im frischen Blut mg-Proz.	Zucker im frischen Blut mg-Proz.	Fett im frischen Blut mg-Proz.	Trockensubstanz Proz.	Körpergewicht g
	Salzgemisch 5 g pro Tag und pro Tier.				
20. VII.	43	56	60	82	5300
24. VII.	42	64	59	80	5250
25. VII.	35	63	53	81	5300
	Kochsalz 5 g pro Tag und pro Tier.				
27. VII.	—	85	—	—	5200
30. VII.	54	98	44	83	5090
1. VIII.	57	—	38	88	4900
3. VIII.	51	79	36	89	4800
6. VIII.	49	65	41	89	4600
8. VIII.	46	87	47	85	4600

Versuch 4.

Fütterung vom 6. bis 18. Juli: Weizeneiweiß 25 g, Reis 37 g, Butter 37 g, Salzgemisch 6 g, Citronensaft 60 ccm, Zucker 11,5 g.

Fütterung vom 19. Juli bis 8. August wie oben, nur mit der Ausnahme, daß die Hunde 6 g Kochsalz erhielten.

Datum	Rest-N im frischen Blut mg-Proz.	Zucker im frischen Blut mg-Proz.	Fett im frischen Blut mg-Proz.	Trockensubstanz Proz.	Körpergewicht g
		Salzgemisch.			
6. VII.	42	50	—	83	6250
10. VII.	45	43	49	82	6200
13. VII.	51	40	—	84	6300
15. VII.	47	—	—	—	6300
18. VII.	43	42	52	81	6400
		Kochsalz.			
20. VII.	63	56	60	82	6300
23. VII.	62	64	59	80	6100
25. VII.	—	63	61	81	6000
27. VII.	61	95	—	83	6000
30. VII.	74	—	44	88	5900
1. VIII.	65	—	38	87	5900
3. VIII.	58	57	36	86	5800
6. VIII.	79	65	41	85	5500
8. VIII.	76	83	48	80	5600

Versuch 5.

Hund 1, Körpergewicht 4800 g, gefüttert mit: 10 g Weizeneiweiß, 15 g Reis, 15 g Butter, 5 g Salzgemisch, 50 g Citronensaft, 4 g Zucker.

Datum	Rest-N im frischen Blut mg-Proz.	Zucker im frischen Blut mg-Proz.	Fett im frischen Blut mg-Proz.	Trockensubstanz Proz.	Körpergewicht g
30. VIII.	74	80	76	87	4800
3. IX.	47	85	57	87	4600
5. IX.	51	82	64	82	4500
7. IX.	43	128	42	85	4500
10. IX.	75	112	80	83	4200
12. IX.	74	116	85	84	4230
Gefüttert wie oben, nur mit der Ausnahme, daß 5 g Kochsalz statt des Salzgemisches gegeben wurde.					
13. IX.	117	113	99	86	4100
15. IX.	116	103	72	85	4000
19. IX.	84	108	93	84	3800
21. IX.	65	78	64	78	3700
22. IX.	—	—	—	—	3600
24. IX.	82	73	85	86	3400

Das allgemeine Ergebnis meiner Versuche, die ich an elf verschiedenen Hunden anstellte, war nun folgendes: Zellsalzarmut der Nahrung bewirkte, abgesehen von der Abnahme des Körpergewichtes, bei meinen Tieren eine Zunahme des Rest-N-Gehaltes des Blutes. In der

Regel vermehrte sich auch etwas der Blutzucker. Der Neutralfettgehalt des Blutes zeigte nur leichte Schwankungen, oft mit einer gewissen Neigung zu einer wenigstens vorübergehenden Vermehrung; man könnte von einer Unruhe sprechen, der infolge des Zellsalzmangels der Blutfettspiegel anheimfällt. Die Trockensubstanz des Blutes endlich blieb unverändert oder zeigte Neigung zu einer geringfügigen Zunahme. Bei den unterernährten Tieren, die schon während der Periode, in der sie Kochsalz und Zellsalz erhielten, an Körpergewicht abgenommen hatten, blieb in dieser Periode der Rest-N-Gehalt konstant, Blutzucker und Blutfett vermehrten sich, die Bluttrockensubstanz blieb unverändert. Mit dem Einsetzen der zellsalzfreien Periode aber nahm das Körpergewicht stärker ab, der Rest-N im Blute vermehrte sich, der Blutzucker zeigte keine deutliche Veränderung, der Blutfettgehalt nahm vorübergehend leicht zu, der Wert für die Trockensubstanz des Blutes war derselbe wie in der Vorperiode. Es wird also bei unterernährten Tieren durch den Ersatz der Zellsalze durch Kochsalz die durch die Unterernährung an sich schon bedingte Störung in gewissem Sinne verstärkt.

Im Hungerzustande (nicht Unterernährung und nicht Durstzustand!) zeigt das Blut folgende Veränderungen:

1. Rest-N- und Aminosäuregehalt des Blutes steigen kontinuierlich an (vgl. *Alpern*, diese Zeitschr. **138**, Heft 1/3).

2. Der Blutzucker vermehrt sich bald mehr, bald weniger (Literatur s. bei *Collazo*, diese Zeitschr. **136**, Heft 1/3).

3. Der Blutfettgehalt nimmt ab (vgl. *Asada*, Der Fettstoffwechsel bei Avitaminose, II, diese Zeitschr. **142**, Heft 1/2).

Im mittleren Stadium der ausgesprochenen Avitaminose zeigt das Blut folgende Veränderungen:

1. Rest-N- und Aminosäuregehalt des Blutes steigen an (*Alpern*, l. c.).

2. Der Blutzucker ist vermehrt (*Collazo*, l. c.).

3. Der Blutfettgehalt ist vermehrt (Literatur bei *Asada*, l. c.).

Aus dieser Zusammenstellung erhellt, daß der Blutchemismus der kalorisch suffizient aber zellsalzfrei ernährten Tiere große Ähnlichkeit mit demjenigen avitaminöser Tiere hat. In beiden Fällen steigt der Rest-N und der Blutzucker an, nur die Blutfettvermehrung, die bei den avitaminösen Tieren deutlich vorhanden ist, ist bei den zellsalzfrei ernährten Tieren höchstens leicht angedeutet. Zwischen den beiden Tiergruppen aber, nämlich den kalorisch suffizient aber zellsalzfrei ernährten Tieren und den avitaminös ernährten Tieren einerseits und den Hungertieren andererseits besteht der Unterschied, daß beim

Hungertiere das Blutfett abnimmt, während es beim zellsalzfrei ernährten Tiere undeutlich, bei dem avitaminösen Tiere aber deutlich zunimmt. Auch beim unterernährten, zellsalzhaltig ernährten Tiere bewirkt die Wegnahme der Zellsalze nur eine sehr geringfügige Steigerung des durch die Unterernährung an sich schon bedingten erhöhten Blutfettgehaltes.

Die zellsalzfreie Ernährung führt also ähnlich wie die Unterernährung oder der Hunger oder die Avitaminose zu einer Steigerung der Stoffbewegung im Körper (*Arnoldi*), ja man könnte hier auch noch in diesem Zusammenhang an den diabetischen Zustand erinnern. Das Ausmaß der Bewegung bei diesen verschiedenen Zuständen im Hinblick auf die einzelnen Stoffe ist verschieden.

Wenn die Vermehrung des Rest-N-Gehaltes im Blute einen erhöhten N-Zerfall in den Zellen anzeigt, worauf ja auch die negative N-Bilanz bei dem avitaminös oder sehr lange Zeit zellsalzfrei ernährten Hunde hinweist, dann ist es auffallend, daß trotz des gesteigerten Blutzuckergehaltes und des normalen oder gesteigerten Blutfettgehaltes im avitaminösen und im zellsalzarmen Zustande die Körperzellen offenbar die angebotene Nahrung nicht in genügendem Umfange aufnehmen. Andererseits legt die Ähnlichkeit dieser beiden Zustände mit dem echten Hungerzustande bzw. der Unterernährung uns die Frage vor, die ja auch bei dem Avitaminoseproblem eine so große Rolle spielt, ob bei der zellsalzfreien Ernährung nicht auch Resorptionsstörungen im Darme auftreten können, die die beobachteten Erscheinungen an dem Stoffwechsel erklären. Diese Frage bedarf noch der genaueren Untersuchung. Aus dem *Asada*schen Stoffwechselversuche am Hunde bei zellsalzfreier Ernährung läßt sich allerdings keine Resorptionsstörung herleiten, wenn man die Trockenkotmengen und den Kot-N-Gehalt berücksichtigt. Bei diesem Versuche betrug die Trockenkotmenge pro Tag in der ersten zellsalzfreien Periode vom 78. bis 104. Versuchstage 8,88 g bei 0,07 g N, in der folgenden Zellsalzperiode vom 105. bis 146. Tage 6 g bei 0,05 g N, in der daran anschließenden zellsalzfreien Periode vom 147. bis 176. Tage 6,17 g bei 0,04 g N.

Wenn auch die bisher vorliegenden Untersuchungen über den Einfluß einzelner Salze oder Salzgruppen auf die Leistungen der organischen Substanz uns schon tiefere Einblicke in die Wirkungen der Salze haben tun lassen, so bedarf es doch noch der Sammlung eines größeren kasuistischen Materials, bevor wir daran gehen können, uns ein Bild von diesen Wirkungen aufzuzeichnen, das eine gewisse Allgemeingültigkeit beanspruchen darf. Gerade das Studium der Avitaminose hat uns die Polymorphie in den Krankheitsbildern kennengelehrt, die durch ein und dieselbe Krankheitsursache nicht nur bei

verschiedenen Tierarten, sondern auch bei verschiedenen Individuen derselben Art auftreten. Das zeigt sich z. B. im Verhalten des Körpergewichtes, im Verhalten der N-Bilanz, in einem verschiedenen Verhalten der Kreislauforgane, des Nervensystems und in dem bald mehr akut, bald mehr chronisch verlaufenden Charakter der Krankheit. So ist es wohl möglich, daß auch beim Entzuge einzelner Salze oder Salzgruppen bei verschiedenen Tieren die dadurch erzeugten Erscheinungen differieren können.

Literatur.

1) *Yoshio Yamasaki*, Virchows Arch. **245**. — 2) *N. Hirabayashi*, erscheint in Virchows Archiv. — 3) *Asada*, diese Zeitschr. **140**. — 4) *Straub*, Zeitschr. f. Biol. **87** und **88**. — 5) *Gruber*, Verhandl. d. 71. Naturforscherversammlung in München 1899. — 6) *Belli*, Zeitschr. f. Biol. **45**.

Versuche über die Nachweisbarkeit immunisatorisch bedingter Fermentprozesse. I.

Von

Ernst Kupelwieser, Graz.

(Eingegangen am 11. Januar 1924.)

Die Absicht, quantitative Untersuchungen über proteolytische Serumfermente anzustellen, wurde mir zur Veranlassung, mich mit der von *F. Pregl* und *M. de Crinis*[1]) angegebenen Methode des refraktometrischen Nachweises von Abwehrfermenten eingehend zu befassen. Das Verfahren hat alle Vorteile einer Mikromethode, liefert in den eine stattgehabte Fermentwirkung anzeigenden Brechungsindexzunahmen zahlenmäßige Ergebnisse und ließ hoffen, daß sich deren Abhängigkeit von einer bestimmten Seite der Fermentwirkung (der Auflösung des festen Substrats in der Systemflüssigkeit) leicht ermitteln lassen werde; es bot somit eine viel versprechende Grundlage zur Ausarbeitung einer quantitativen Methode für das Studium proteolytischer Fermentwirkungen des Serums.

Um mit der Methodik vertraut zu werden, versuchte ich mich zunächst an dem für Abwehrfermente[2]) typisch gewordenen Beispiel der Schwangerschaftsreaktion. Diese nach der ursprünglichen Vorschrift angestellten Vorversuche lieferten jedoch durchwegs negative Resultate, denen ich aber wegen meiner ungenügenden Kenntnis der Fehlerquellen und der Größe ihres Einflusses auf das Versuchsergebnis kein allzu großes Gewicht beilegen zu müssen glaubte. Ich richtete nun bei der auch zu anderen Zwecken[3]) durchgeführten Bearbeitung des Verfahrens[4]) mein Augenmerk auf die methodischen Besonderheiten, die das Arbeiten mit Serum mit sich bringt, da ich von einer möglichst

---

[1]) *F. Pregl* und *M. de Crinis*, Fermentforschung **2**, 58, 1917.

[2]) Der Kürze halber bleibe ich bei dieser Benennung des hypothetischen Trägers der hier behandelten Serumwirkung, ohne damit etwas über Existenz und Art des Trägers oder über das Wesen der untersuchten Reaktion aussagen zu wollen.

[3]) *E. Kupelwieser* und *O. Rösler*, diese Zeitschr. **136**, 38, 1923.

[4]) *E. Kupelwieser*, ebendaselbst **131**, 413, 1922.

vollständigen Diskussion der Fehlerquellen die Aufklärung des negativen Ausfalles der versuchten Schwangerschaftsreaktion erwartete und hoffte, auf diesem Wege doch noch zu einer sicher gehenden quantitativen Methode zur Verfolgung von Abwehrfermentwirkungen zu kommen.

Die der Methodik gewidmete Vorarbeit ergab neben den bei quantitativem Arbeiten einzuhaltenden Versuchsbedingungen auch für den Abwehrfermentnachweis gegenüber der Originalvorschrift einige Abänderungen, die jedoch das Wesentliche des Verfahrens nicht berühren. Es zeigte sich, daß die unter Ib (S. 432)[1]) aufgezählten Fehlermöglichkeiten sich bei Einhalten meiner Versuchsbedingungen so weit beherrschen lassen, daß man Brechungsindexzunahmen von über 0,00010 im allgemeinen als Zeichen einer stattgehabten Fermentwirkung nehmen darf. Die selbstverständlich nur in bezug auf ein bestimmtes Fermentpräparat angebbare Empfindlichkeit der Methode (S. 470 bis 471) erwies sich als sehr erheblich: Es ergab z. B. die bei Zimmertemperatur untersuchte 24stündige Wirkung einer 0,0005proz., schwach alkalischen (n/1000) Lösung eines guten Trypsinpräparates (*Merck* vom Jahre 1913) Ausschläge vom doppelten Betrage des obigen Grenzwertes. Ferner ließ sich berechnen, daß die fermentative Auflösung von 0,0005 g Eiweißsubstrat in 0,5 ccm Systemflüssigkeit noch deutlich positive Ausschläge gibt: Bei Verwendung von 0,01 g Substrat genügt es also, wenn $^1/_{20}$ = 5 Proz. der Gesamtmenge des vorgelegten Substrats aufgelöst werden, um den Fermentnachweis positiv ausfallen zu lassen. Versuche mit Trypsin als Ferment und verschiedenen Substraten zeigten, daß die Methode im untersuchten Bereich (bis Brechungs-

---

[1]) Dieser und die folgenden Hinweise beziehen sich auf meine oben zitierte ausführliche Arbeit im 131. Bande (S. 413ff.) dieser Zeitschrift, auf welche ich mich in allen hier nicht ausgeführten Einzelheiten stütze. Ich benutze die Gelegenheit, einige in dieser Arbeit stehengebliebene Druckfehler, die zu Mißverständnissen Anlaß geben könnten, hier richtigzustellen:

S. 424 in der ersten in der Anmerkung stehenden Tabelle: statt 1,34948 1,34946.
S. 431 unten; der mittlere bzw. der wahrscheinliche Fehler des Mittelwertes ist statt mit e bzw. e_w mit E bzw. E_w zu bezeichnen.
S. 432, Tabelle X und S. 464, 4. Zeile von oben: statt + 0,00005 ± 0,00005.
S. 440, 19. Zeile von oben: statt Filtrat Substrat.
S. 450, 22. Zeile von oben: statt binden finden.
S. 451, Tabelle XXV, Überschrift der zweiten Kolumne: statt V_B V_Q.

Die Hinweise sollen lauten auf:

S. 450, Anmerkung 3:	statt	S. 444	S. 445.
S. 460, Anmerkung 1:	,,	S. 447	S. 448.
S. 461 im Text:	,,	S. 432	S. 435.
S. 467 ,, ,,	,,	S. 465	S. 444.
S. 469 ,, ,,	,,	S. 432	S. 464.

indexzunahmen von 0,00150) ausschließlich und rein die fermentative Auflösung des festen Substrats in der Systemflüssigkeit erfaßt, während der Abbau des schon Gelösten sich der Beobachtung entzieht (S. 464 bis 466); ferner erwiesen sich die Brechungsindexzunahmen innerhalb der Fehlergrenze des Fermentversuches als direkt proportional der gelösten Substratmenge (S. 466 bis 467). Das Verfahren kann deshalb als Maßmethode für die Untersuchung der fermentativen Auflösung koagulierter Proteine verwendet werden, wie es sich wegen seiner hohen Empfindlichkeit als Anzeigemethode zum Nachweis sehr geringer Fermentwirkungen dieser Art eignet.

Ausdrücklich sei betont, daß die angegebenen Zahlen nur für meine Versuchsbedingungen gelten, und es muß besonders hervorgehoben werden, daß die Fehlerbreite verhältnismäßig am meisten von der beim Abbauversuch verwendeten Menge der Systemflüssigkeit abhängt: Allein an dem durch die „Benetzungsflüssigkeit" (Absatz Ib, 5, S. 442ff.) bedingten, unvermeidlichen Fehler läßt sich zeigen, daß bei Verminderung der Systemflüssigkeit unter sonst gleichen Umständen die Ausschläge *und* die Fehler zunehmen; aber während z. B. ein Vermindern der Systemflüssigkeit auf die Hälfte die einen bestimmten Umsatz anzeigende Brechungsindexzunahme — also die ihr direkt proportionale Empfindlichkeit — auf das Doppelte steigert, vervierfachen sich die absoluten Fehler (S. 455 und 456, Tabelle XXX). Das Verhältnis: Empfindlichkeit/Fehlerbreite verschiebt sich also mit abnehmender Menge der Systemflüssigkeit in ungünstigem Sinne. Dasselbe wie für die Benetzungsflüssigkeit gilt auch für alle anderen Fehlerquellen, die unabhängig sind von der Menge der Systemflüssigkeit und daher bei deren Verminderung verhältnismäßig mehr ins Gewicht fallen.

Unter peinlichster Einhaltung aller Vorsichtmaßregeln, die sich mir aus der quantitativen Diskussion der Fehlermöglichkeiten als notwendig ergeben hatten, stellte ich nun eine neue Versuchsreihe zum Nachweis einer fermentativen Auflösung der Placentapräparate im Schwangerenserum an. Wider Erwarten fielen auch diese Versuche negativ aus: Bei den 34 Versuchen dieser Reihe erzielte ich ein einziges Mal einen knapp über der früher ermittelten Fehlergrenze liegenden positiven Wert [Tabelle II, Nr. 24; $n_{D_2} - n_{D_1} = 0{,}00013$[1])]. Diesem vereinzelten höheren Werte steht jedoch eine mit dem gleichen Serum und dem gleichen Substrat angestellte, sicher negative Untersuchung zur Seite, so daß man auch diesen Fall nicht als gelungenen Nachweis der gesuchten Fermentreaktion ansprechen kann: er zeigt nur, daß

[1]) Überdies ist der Wert unsicher, da bei der betreffenden Untersuchung die Ablesung für die erste und für die zweite Brechungsindexbestimmung nicht am gleichen Skalenteilstrich vorgenommen werden konnte. Zwar habe ich dies durch eine Reduktion der zweiten Bestimmung auszugleichen gesucht (siehe die Anmerkung zu Nr. 24 der Tabelle II), jedoch so, daß + 0,00013 die in diesem Falle größtmögliche aber nicht die notwendig erreichte Brechungsindexzunahme bedeutet.

die im allgemeinen gültige Fehlergrenze unter Umständen doch überschritten werden kann, hier nach der positiven, wie z. B. bei Nr. 16 nach der negativen Seite.

Da es mir auch bei weiterer Beschäftigung mit der Mikro-Abderhalden-Reaktion nicht gelungen ist, zu positiven Ergebnissen zu kommen, teile ich diese weiter zurück liegenden Versuche mit, in der Meinung, daß auch ein negativer Befund zur Klärung einer Frage beitragen kann.

Beschreibung der Versuche.

Die *Blutproben* für die Schwangerschaftsversuche stammen von Schwangeren im 7. bis 10. lun. Monat aus der geburtshilflichen Universitätsklinik; für Kontrollversuche verwendete ich Blut männlicher, afebriler Patienten aus der chirurgischen Abteilung des Paulustor-Spitales, Graz[1]). Die zu untersuchende Blutprobe wurde unter aseptischen Vorsichtsmaßregeln (bei Vermeidung von Jodtinktur und Sublimat) aus der Vena cubit. entnommen und in einem sterilen Zentrifugiergläschen aufgefangen. Dann wurde die in diesem Gefäß geronnene Blutprobe 10 Minuten lang zentrifugiert, das Serum mit einer sterilen Pipette (Wattepfropf) abgehoben, in ein steriles Probierröhrchen gebracht und bis zum Versuchsbeginn wohlverschlossen sowie lichtgeschützt bei der Temperatur des fließenden Wasserleitungswassers (+ 8 bis + 10^0 C) aufgehoben.

Als *Substrate* nahm ich drei nach den Angaben *F. Pregls*[2]) hergestellte Placentapräparate; es sind dies die in meiner wiederholt angeführten methodischen Arbeit mit „Plac. I", „Plac. II" und mit „Plac. III" bezeichneten Präparate (S. 434). Plac. I und II waren ältere Präparate, Plac. III hatte ich kurz vor seiner Verwendung hergestellt in der Absicht, auch ein ganz frisches und bei der Bereitung möglichst glimpflich behandeltes Substrat zu untersuchen: Alle zur Herstellung der Trockenplacenta nötigen Maßnahmen (Ausschütteln mit Alkohol und Äther, sowie das Auskochen) kürzte ich möglichst ab. Die ganze Bereitung vom Zerkleinern der frischen Placenta bis zum Trocknen des fertigen Präparates erfolgte innerhalb eines Tages. Bei dieser abgekürzten Herstellungsart konnte ich natürlich nicht damit rechnen, ein Trockenpräparat von so geringer spontaner Löslichkeit zu erhalten, wie ich sie sonst von den Substraten verlangte: Plac. III gab bei der Prüfung seiner Löslichkeit etwas mehr lösliche Bestandteile ab als die anderen Präparate (S. 434 bis 435, Tabelle XI), ohne daß sich dies jedoch beim Serumversuch störend bemerkbar gemacht hätte. Andererseits erwies sich Plac. III gegenüber geringen Trypsinkonzentrationen als das abbaufähigste der drei hier verwendeten Substrate (S. 471, Tabelle XXXVI); gegenüber höheren Konzentrationen dieses Fermentes verhielt sich die relative Abbaufähigkeit meiner Substrate: Abbaufähigkeit von Plac. I = Abbaufähigkeit von Plac. III > Abbaufähigkeit von Plac. II (S. 453, Tabelle XXVII). Die übrigen Eigenschaften der Substrate, wie Quellbarkeit usw., sind ebenfalls

[1]) Den Herren Doz. Dr. *Mahnert* und Dr. *Lundwall* von der geburtshilflichen Universitätsklinik in Graz und Herrn Dr. *Brauch* von der chirurgischen Abteilung des Paulustor-Spitales, Graz, erlaube ich mir für die Beschaffung der Blutproben an dieser Stelle zu danken.

[2]) *F. Pregl*, Fermentforschung 1, 7, 1914.

aus der ausführlichen Bearbeitung der Methodik zu entnehmen, da bei den zur Prüfung der Substrateigenschaften dort angestellten Versuchen neben anderen meist diese drei Substrate verwendet worden waren.

Auch die *Ausführung der Untersuchungen* beschreibe ich hier nur ganz kurz und verweise bezüglich aller Einzelheiten und deren Begründung auf meine obige Arbeit (besonders S. 461 bis 462):

Je 0,01 g Substrat wurden auf ± 0,001 g genau in die Versuchsgläschen eingewogen, dann wurde siedende physiologische Kochsalzlösung zugesetzt und eine halbe Stunde am Wasserbade (etwa + 95° C), sowie mindestens ebensolange bei Zimmertemperatur quellen gelassen. (Bei den Untersuchungen Nr. 19 bis 34 der Tabelle II habe ich — um hierin möglichst wenig von der Originalvorschrift abzuweichen — die Gläschen nach dem Zusatz der siedenden Kochsalzlösung einfach 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen.)

Abart A:

Nach dem Quellen die Kochsalzlösung abgesaugt,
0,5 ccm Serum zum gequollenen Substrat zugesetzt,
10 Minuten am Mischer gemischt,
5 Minuten absetzen lassen, dann dieses „Waschserum" abgesaugt und verworfen;
nun 0,55 ccm neues Serum zugesetzt,
5 Minuten gemischt und 5 Minuten später die erste Probe (0,05 ccm) entnommen.

Abart B:

Nach dem Quellen die Kochsalzlösung abgesaugt,
0,55 ccm Serum zugesetzt,
5 Minuten gemischt und 5 Minuten später die erste Probe (0,05 ccm) entnommen.

In dieser ersten Probe wurde nun der Brechungsindex bestimmt: „n_{D_1}". Nach der Probeentnahme blieben neben dem Substrat 0,5 ccm Serum als Systemflüssigkeit im Versuchsgläschen zurück. Dieses wurde nun gut verschlossen und der Verschluß durch Anwendung des Halters (S. 433, Abb. 1) gesichert; eine an jedem Gläschen nach der Probeentnahme angebrachte Marke („Verdunstungsmarke", S. 434) bezeichnete den Flüssigkeitsstand zu Beginn des Versuches, um während des Versuches doch etwa eingetretene Flüssigkeitsverluste feststellen zu können. Die Gläschen samt Inhalt blieben nun während der „Versuchsdauer" lichtgeschützt bei Zimmertemperatur[1]) in horizontaler Lage liegen; etwa viermal während der Versuchsdauer wurden sie für je eine halbe Stunde auf den Mischer gebracht.

Am Ende des Versuches wurde dann in einer zweiten, jedem Gläschen entnommenen Probe der Brechungsindex des flüssigen Systemanteils neuerdings bestimmt: „n_{D_2}". Als Versuchsergebnis wurde die Differenz $n_{D_2} - n_{D_1}$ verzeichnet.

Die *Bestimmung* der Brechungsindices führte ich mittels des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers (Nr. 13807 und 13808 der Firma C. Zeiss) so aus, wie ich dies im Abschnitt Ia (S. 418 ff.) der methodischen Vorarbeit beschrieben habe. Hier sei nur hervorgehoben, daß die erste und zweite n_D-Bestimmung jeder Untersuchung bei unveränderter Spiegel- und

---

[1]) Die während der Versuchsdauer herrschende Zimmertemperatur habe ich zu Beginn, während und am Ende des Versuches gemessen und in den Tabellen angegeben.

Blendenstellung vorgenommen wurde und daß jeder in den folgenden Tabellen eingetragene Skalenwert ein Mittelwert aus zehn Einzelablesungen ist. Die Bestimmung des n_{D_2} ist immer unwissentlich gemacht, d. h. ich sorgte dafür, daß ich zur Zeit der zweiten n_D-Bestimmung den bei der zugehörigen ersten gefundenen Wert vergessen hatte [1]). Wenn bei der ersten n_D-Bestimmung die Grenzlinie nur um etwa 0,1 Skalenteil von einem Teilstrich der Hauptskala entfernt war, habe ich sowohl am nächst höheren, wie am nächst niederen Skalenteilstrich je eine Ablesungsreihe gemacht (in solchen Fällen ist in den Tabellen der Skalenteilstrich, an dem abgelesen wurde, als eingeklammerter Index dem betreffenden Skalenwert beigefügt); verglichen habe ich dann möglichst nur jene n_{D_1} und n_{D_2}, die durch Ablesung am gleichen Skalenteilstrich ermittelt worden waren, da der beim Übergang zum nächsten Teilstrich der Skala eventuell eintretende Sprung kleinen Differenzen gegenüber bereits merklich ins Gewicht fällt [2]).

Mit jedem Serum stellte ich mindestens zwei Versuche an; außerdem untersuchte ich immer je eine Probe des Serums allein (ohne Substrat), die unter Weglassung der mit dem Serumzusatz verbundenen Maßnahmen ebenso behandelt wurde, wie die aus Serum und Substrat zusammengesetzten Reaktionssysteme. (In einigen Fällen habe ich mangels einer genügenden Anzahl von Versuchsgläschen anstatt eines solchen für das Serum eine Glasphiole von entsprechender Größe verwendet.)

Es folgt nunmehr die *tabellarische Zusammenstellung der Versuche*: Tabelle I umfaßt die mit Seren von Männern ausgeführten Kontrollversuche, Tabelle II die Versuche mit Schwangerenseren.

(Die Abkürzungen: Skal.$_1$ und Skal.$_2$ bedeuten die bei der ersten bzw. zweiten Bestimmung im Mittel abgelesenen Skalenteile der Refraktometerskala; n_{D_1} und n_{D_2} die aus den zugehörigen Skalenwerten berechneten Brechungsindices, reduziert auf die Wellenlänge der Natriumlinie D.)

Anmerkungen zu Tabelle II.

Zu Nr. 24. Bei der ersten n_D-Bestimmung wurde am Teilstrich 54, bei der zweiten am Teilstrich 55 der Refraktometerskala abgelesen. Wegen des beim Wechsel des Skalenteilstriches eintretenden Sprunges mußte man von Skal.$_2$ *mindestens* 0,1 Skalenteile abziehen, um n_{D_2} mit n_{D_1} vergleichen zu können: statt Skal.$_2$ 55,38 und dem zugehörigen n_{D_2} 1,34850 war also zu setzen Skal.$_2$ 55,28 bzw. n_{D_2} 1,34846, daher statt $n_{D_2} - n_{D_1} = + 0{,}00017$ nur $n_{D_2} - n_{D_1} = + 0{,}00013$.

Zu Nr. 26, 27 und 28. In diesen Fällen war zur ersten n_D-Bestimmung keine scharfe Grenzlinie zu erzielen: Der dunkle Teil des Gesichtsfeldes war vom hellen durch einen schmalen, grauen Streifen getrennt, so daß man entweder auf die Grenze zwischen hellem Teil des Gesichtsfeldes und dem Streifen oder auf die Grenze zwischen Streifen und dem dunklen Teil

---

[1]) Wenn ich mir eine oder die andere der am Vortag gefundenen Skalenwerte wider Willen gemerkt hatte, suchte ich das die Objektivität störende Erinnerungsbild durch Abschreiben einiger älterer Ablesungsreihen zu verdrängen, was meist rasch gelingt.

[2]) Vgl. hierzu S. 423, Anmerkung 1 der methodischen Vorarbeit. Inzwischen wurde ich von der Firma Zeiss belehrt, daß der beschriebene Übelstand von einem Fehler bei der Justierung des Instrumentes herrührt und beseitigt werden kann.

Tabelle I.

Männer-Serum („M. S.")	Blutentnahme	Zentrifugiert	Versuchsbeginn	Ausführung der Untersuchung	Versuchsdauer Std.	Versuchstemp. °C	Temperatur des Temperierbades in °C bei der n_D-Bestimmung 1	2	Substrat	Kontrollversuch Nr.	Skal.₁	n_{D_1}	Skal.₂	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
M. S. I 17 jähriger Mann (Verletzung am Unterarm; afebril)	27. IX. 21; 3h p	27. IX. 21; 4h p	28. IX. 21; 10h a	A	24	+17, +15, +16	+ 17,5		Serum allein		58,67	1,349 72	58,58	1,349 68	— 0,000 04
							± 0,02	± 0,02	Placenta I	1	58,92	9 81	58,98	9 83	+ 0,000 02
									Placenta I	2	58,73	9 74	58,90	9 80	+ 0,000 06
									Placenta II	3	58,71	9 73	58,89	9 80	+ 0,000 07
M. S. II 24 jähriger Mann (Amputation des Oberschenkels; afebril)	29. IX. 1921; 3h p	3h 15 p	3h 50 p	A	24	+ 18, + 14, + 16	± 0,01	± 0,01	Serum allein		64,28	1,351 79	64,08	1,351 72	— 0,000 07
									Placenta II	4	64,79	1 97	64,94	2 03	+ 0,000 06
									Placenta II	5	64,50	1 87	64,40	1 83	— 0,000 04
									Placenta I	6	64,61	1 91	64,61	1 91	0,000 00
									Placenta I	7	64,35	1 82	64,32	1 80	— 0,000 02
M. S. III 24 jähriger Mann (Radialis-Aneurhysma; afebril)	19. XI. 1921; 12h a	1h p	4h p			+ 19, + 17, + 20	± 0,05	± 0,07	Serum allein		62,33	1,351 07	62,38	1,351 09	+ 0,000 02
				B	24				Placenta III	8	61,78	0 87	61,90	0 91	+ 0,000 04
				B	24				Placenta III	9	61,73	0 85	61,65	0 82	— 0,000 03
				A	24				Placenta III	10	62,62	1 18	62,72	1 22	+ 0,000 04
				A	24				Placenta III	11	62,58	1 16	62,50	1 13	— 0,000 03
M. S. IV 46 jähriger Mann (Elefantiasis am linken Arm; afebril)	21. XI. 1921; 12h a	1h 30 p	5h p	B	24	+ 20	± 0,05	± 0,08	Serum allein		63,90	1,351 65	63,80	1,351 62	— 0,000 03
									Placenta I	12	62,78	1 24	62,60	1 17	— 0,000 07
									Placenta I	13	62,85	1 26	62,88	1 28	+ 0,000 02
									Placenta II	14	62,32	1 07	62,48	1 13	+ 0,000 06
									Placenta II	15	62,38	1 09	62,28	1 05	— 0,000 04

des Gesichtsfeldes einstellen konnte. Die bei der ersten bzw. zweiten Einstellung gewonnenen Werte habe ich mit dem Index *a* bzw. *b* versehen. Bei der n_D-Bestimmung am Ende der Versuche war eine scharfe Grenzlinie vorhanden. Ich habe in jedem Falle beide mögliche Differenzen gebildet und in der Tabelle angegeben.

Zu S. S. XI, „Serum allein". Hier war bei der Untersuchung des Serums ohne Substrat statt des Versuchsgläschens eine Glasphiole verwendet worden, bei deren Zuschmelzen sich durch zu starkes Erhitzen ein kleines Gerinnsel im Serum gebildet hatte; dies dürfte an der starken Abnahme des Brechungsindex schuld sein.

Ergebnis.

Die Betrachtung der letzten Spalte der Tabelle II zeigt, daß die beobachteten Ausschläge in einem Bereich von $-0{,}00012$ bis $+0{,}00013$ liegen, welche begrenzenden Werte man jedoch nur ausnahmsweise auftreten sieht. Da ich bei der Untersuchung mit Fehlern von eben dieser Größenordnung zu rechnen hatte, sind die Ergebnisse der einzelnen Versuche hinsichtlich des Nachweises der gesuchten Fermentwirkung negativ zu nennen.

Das schließt zunächst nicht aus, daß sehr geringe Fermentwirkungen dieser Art, soweit ihnen keine das obige Bereich überschreitenden n_D-Zunahmen entsprechen, doch vorgekommen sein können. Solche kleine, bei den einzelnen Versuchsergebnissen im Fehlerbereich verborgene positive Ausschläge müßten jedoch eine in diesem Sinne gerichtete Verschiebung des aus einer Mehrzahl der Versuchsresultate gebildeten Mittelwertes zur Folge haben. Der Vergleich dieses Mittelwertes mit einem aus entsprechenden Kontrollversuchen gewonnenen ermöglicht es zu erkennen, ob eine fermentative Auflösung der Substrate stattgefunden hat, selbst wenn die Ausschläge etwa nur von der Größenordnung der Fehler wären, mit denen die Mittelwerte behaftet sind.

Um dies für mein Beobachtungsmaterial zu entscheiden, bilde ich das arithmetische Mittel aus den Ergebnissen:

a) der Versuche mit Serum allein[1]): M_a,

b) der Versuche mit Männerserum + Placenta (Tabelle I, Nr. 1 bis 15): M_b,

c) der Versuche mit Schwangerenserum + Placenta (Tabelle II, Nr. 1 bis 34): M_c.

Wegen der spurenweisen spontanen Löslichkeit der Substrate ist zu erwarten, daß der erste Mittelwert etwas kleiner sein wird als der zweite. Eine, wenn auch geringe fermentative Auflösung der

---

[1]) M_a ist gebildet aus den Resultaten der Serumkontrollen beider Versuchsreihen (Tabelle I und II); ausgeschlossen habe ich den Fall: Tabelle II, S. S. XI, da dort ein grober Fehler vorliegt.

Tabelle II.

Schwangeren-Serum („S. S.")	Blutentnahme	Zentrifugiert	Versuchsbeginn	Ausführung der Untersuchung	Versuchsdauer Std.	Versuchstemp. °C	Temperatur des Temperierbades in °C bei der n_D-Bestimmung 1	2	Substrat	Schwangerschaftsversuch Nr.	Skal.₁	n_{D_1}	Skal.₂	n_{D_2}	$n_{D_2}-n_{D_1}$	Bemerkungen
S. S. I. 32 jährige 1.-para im 10. lun. Monat	3. X. 21 etwa 8h a	9h a	4h p	A	24	+19, +17, +19	+ 17,5		Serum allein		57,77	1,349 38	57,90	1,349 43	+ 0,000 05	
							±0,01	±0,03	Placenta II	1	57,92	9 44	58,08 (57)	9 50	+ 0,000 06	
										2	58,03 (57)	9 48	58,05 (57)	9 49	+ 0,000 01	
											58,19 (58)	9 54	58,19 (58)	9 54	0,000 00	
									Placenta I	3	58,33	9 59	58,15	9 52	— 0,000 07	
										4	57,98 (57)	9 46	58,08 (57)	9 50	+ 0,000 04	
											58,20 (58)	9 54	58,24 (58)	9 56	+ 0,000 02	
S. S. II. 36 jährige 1.-para im 7. lun. Monat	6. X. 21 etwa 8h a	9h 20 a	3h 30 p	A	24	+17, +16, +18	±0,02	±0,05	Serum allein		57,20	1,349 17	57,09	1,349 13	— 0,000 04	
									Placenta II	5	57,37	9 24	57,38	9 24	0,000 00	
										6	57,37	9 24	57,35	9 23	— 0,000 01	
									Placenta I	7	57,35	9 23	57,38	9 24	+ 0,000 01	
										8	57,35	9 23	57,23	9 18	— 0,000 05	
S. S. III. 36 jährige 5.-para im 9. lun. Monat	10. X. 21 zw. 8 u. 9h a	9h 15 a	10h a	B	27	+20, +22, +19	±0,06	±0,05	Serum allein		53,16	1,347 67	53,28	1,347 71	+ 0,000 04	
				A					Placenta II	9	52,50	7 42	52,59	7 46	+ 0,000 04	
				B						10	53,26	7 71	53,29	7 72	+ 0,000 01	
				A					Placenta I	11	52,72	7 51	52,78	7 53	+ 0,000 02	
										12	53,21	7 69	53,49	7 79	+ 0,000 10	
S. S. IV. 1.-para im 9. lun. Monat	13. X. 21 zw. 8 u. 9h a	9h 20 a	3h p	B	24	+21, +17, +19	±0,06	±0,05	Serum allein		61,15	1,350 63	61,20	1,350 65	+ 0,000 02	
				A					Placenta II	13	60,40	0 36	60,51	0 40	+ 0,000 04	
				B						14	61,14	0 63	61,25	0 67	+ 0,000 04	
				A					Placenta I	15	60,25	0 30	60,37	0 35	+ 0,000 05	
										16	61,34	0 71	61,03	0 59	— 0,000 12	
S. S. V. Schwangere im 10. lun. Monat	2. XI. 21 etwa 9h a	10h a	4h p	B	24	+17	±0,04	±0,03	Serum allein		59,15 (58)	1,349 89	59,11 (58)	1,349 88	— 0,000 01	
											59,30 (59)	9 95	59,31 (59)	9 95	0,000 00	
									Placenta III	17	58,38	9 61	58,63	9 70	+ 0,000 09	
										18	58,41	9 69	58,40	[illegible]	0,000 00	

1.—para im 9. lun. Monat		ca. 9h a	10h a	2h 30p	B	24	+17;17	±0,0	±0,0	Placenta III	19	57,77	9 38	57,78	9 39	+ 0,000 01	
											20	57,61	9 33	57,53	9 30	— 0,000 03	
S. S. VII. 5.—para im 10. lun. Monat	5. XI. 21	ca. 9h a	10h a	4h p	B	24	+ 17; 17; 15	± 0,05	± 0,04	Serum allein		58,55	1,349 67	58,66	1,349 71	+ 0,000 04	
										Placenta III	21	57,92	9 44	57,89	9 43	— 0,000 01	
											22	58,03 (57)	9 48	57,89 (57)	9 43	— 0,000 05	
												58,19 (58)	9 54	—	—	—	
S. S. VIII. 2.—para im 10. lun. Monat	8. XI. 21	ca. 9h a	10h a	3h 45p	B	27	+ 21; 19; 20	± 0,04	± 0,01	Serum allein		55,47	1,348 53	55,50	1,348 54	+ 0,000 01	
										Placenta III	23	54,56	8 19	54,54	8 18	— 0,000 01	
											24	54,93 (54)	8 33	55,38 (55)	8 50	(+ 0,000 17)	s. Anmerkung
												—	—	55,28	8 46	+ 0,000 13	
S. S. IX. 2.—para im 9. lun. Monat	8. XI. 21	ca. 9h a	10h a	6h p	B	27	+ 21; 19; 20	± 0,03	± 0,01	Serum allein		53,80	1,347 91	53,83	1,347 92	+ 0,000 01	
										Placenta III	25	53,27	7 71	53,40	7 76	+ 0,000 05	s. Anmerkung
											26	53,05a	7 63a	53,26	7 71	+ 0,000 08	$= {}^nD_2 - {}^nD_1$a
												53,52b	7 80b			— 0,000 09	$= {}^nD_2 - {}^nD_1$b
S. S. X. 22 jährige 2.—para im 10. lun. Monat	10. XI. 21	etwa 9h a	9h 30 a	3h p	B	24	+ 19	± 0,02	± 0,02	Serum allein		60,53	1,350 41	60,70	1,350 47	+ 0,000 06	s. Anmerkung
										Placenta III	27	59,86a	0 16a	59,94	0 19	+ 0,000 03	$= {}^nD_2 - {}^nD_1$a
												60,10b	0 25b			— 0,000 06	$= {}^nD_2 - {}^nD_1$b
											28	59,62a	0 07a	59,82	0 14	+ 0,000 07	$= {}^nD_2 - {}^nD_1$a
												59,86b	0 16b			— 0,000 02	$= {}^nD_2 - {}^nD_1$b
S. S. XI. 20 jährige 1.—para im 9. lun. Monat	10. XI. 21	ca. 9h a	9h 30 a	5h p	B	24	+ 19	± 0,02	± 0,02	Serum allein		60,00	1,350 21	59,61	1,350 07	(— 0,000 14)	s. Anmerkung
										Placenta III	29	58,87 (58)	49 79	58,90 (58)	49 80	+ 0,000 01	
												59,03 (59)	49 85	59,08 (59)	49 87	+ 0,000 02	
											30	58,81	49 77	58,91	49 81	+ 0,000 04	
S. S. XII. 35 jährige 3.—para im 8. lum. Monat	13. XI. 21	etwa 11h a	11h 30 a	3h p	A B	26	+ 20; 19; 20	± 0,01	± 0,03	Serum allein		57,09 (56)	1,349 13	undeutlich (56)	—	—	
												57,18 (57)	9 17	57,14 (57)	1,349 15	— 0,000 02	
										Placenta III	31	57,13	9 15	57,24	9 19	+ 0,000 04	
											32	56,27	8 83	56,30	8 84	+ 0,000 01	
S. S. XIII. 32 jährige 4.—para im 10. lun. Monat	14. XI. 21	ca. 10h a	11h 30 a	4h p	A B	27	+ 20; 19; 19	± 0,04	± 0,05	Serum allein		61,69	1,350 83	61,51	1,350 77	— 0,000 06	
										Placenta III	33	62,22	1 03	62,13	1 00	— 0,000 03	
											34	61,41	0 73	61,36	0 71	— 0,000 02	

Placenta durch das Schwangerenserum aber würde darin zum Ausdruck kommen müssen, daß M_c größer wird als M_b.

Die Rechnung ergibt für die Mittelwerte und deren wahrscheinliche Fehler[1]:

$$M_a = -\ 4 \cdot 10^{-6} \quad \pm 7 \cdot 10^{-6}$$
$$M_b = +\ 9 \cdot 10^{-6} \quad \pm 8 \cdot 10^{-6}$$
$$M_c = +11 \cdot 10^{-6} \quad \pm 6 \cdot 10^{-6}$$

Es zeigt sich, daß M_a mit erheblicher Wahrscheinlichkeit etwas kleiner als M_b genannt werden kann; M_b und M_c aber stimmen im Bereiche ihrer wahrscheinlichen Fehler so weit überein, daß sie als gleich zu bezeichnen sind. Dies, obwohl ich bei den Schwangerschaftsversuchen im Falle von Doppelablesungen (Tabelle II, Nr. 2, 4 und 29) immer den für einen positiven Ausfall günstigeren Wert und bei den zweifelhaften Versuchen (Tabelle II, Nr. 26, 27 und 28) beide Ergebnisse zur Mittelwertsbildung genommen hatte.

Es berechtigt das zu der Aussage, daß unter Einwirkung der Schwangerenseren eine fermentative Auflösung der Placenta auch nicht bis zu n_D-Zunahmen von der Größenordnung der Mittelwertsfehler stattgefunden hat; denn selbst im ungünstigsten Falle wären durch eine Fermentwirkung bedingte Ausschläge von durchschnittlich $+16 \cdot 10^{-6} = +0{,}000016$ noch bemerkt worden.

Zum Schlusse sei noch ein Versuch beschrieben, den ich nach dem Mißlingen des Abwehrfermentnachweises unter meinen bisherigen Versuchsbedingungen, angeregt durch eine Arbeit *J. Hekmans*[2]) angestellt habe. Dieser Autor fand bei Untersuchung der proteolytischen Wirkung des menschlichen Serums (geprüft gegen Casein), daß diese beim Verdünnen des Serums mit NaCl-Lösung deutlicher hervortritt. Eine ähnliche Begünstigung wäre auch für Abwehrfermentreaktionen möglich. Doch auch in dem folgenden Versuche konnte ich einen positiven Ausfall nicht erzielen:

Versuch Nr. 35a bis c. (Dazu Tab. III.)

Schwangerenserum XIV (26 jährige 1.—para im 8. lun. Monat).
Blutentnahme: 16. November 1921 etwa 9 Uhr vormittags.
Zentrifugiert: 16. November 1921, etwa 9 Uhr 30 Minuten vormittags.
Versuchsbeginn: 16. November 1921, etwa 12 Uhr vormittags.
Ausführung der Untersuchung: B (Quellung ohne Wasserbad).
Versuchsdauer: 24 Stunden.
Versuchstemperatur: + 21, + 20, + 20° C.

[1]) Der wahrscheinliche Fehler eines Mittelwertes aus n Versuchsresultaten wird berechnet als

$$E_w = 0{,}674 \sqrt{\frac{\Sigma^n \Delta^2}{n(n-1)}},$$

wobei Δ die Abweichungen des einzelnen Resultates vom arithmetischen Mittel aller bedeutet.

[2]) *J. Hekman*, Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1, 781, 1917 (zitiert nach dem Referat im Zentralblatt für Biochemie und Biophysik **20**, 55, 1919).

Temperatur des Temperierbades bei der ersten und zweiten Bestimmung: + 17,5 ± 0,07 bzw. + 17,5 ± 0,05° C.

Substrat: Placenta III.

Absolute Mengen des Substrates und der Systemflüssigkeit wie bei den früheren Versuchen.

Die Serumverdünnungen sind etwa eine halbe Stunde vor dem Beginn des Versuches bereitet.

Tabelle III.

System	Nr.	Skal.₁	n_{D_1}	Skal.₂	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
Serum (unverdünnt)		54,71	1,348 25	54,62	1,348 22	− 0,000 03
Serum (unverdünnt) + Placenta III	35 a	54,07 (53) 54,20 (54)	48 01 48 06	53,96 (53) —	47 96 —	− 0,000 05 —
1 Vol.-Teil Serum + 1 Vol.-Teil physiol. NaCl-Lsg.		36,79	1,341 54	36,86	1,341 57	+ 0,000 03
1 Vol.-Teil Serum + 1 Vol.-Teil physiol. NaCl-Lsg. + Placenta III	35 b	36,58	41 46	36,74	41 52	+ 0,000 06
1 Vol.-Teil Serum + 24 Vol.-Teile physiol. NaCl-Lsg.		20,60	1,335 36	20,76	1,335 42	+ 0,000 06
1 Vol.-Teil Serum + 24 Vol.-Teile physiol. NaCl-Lsg. + Placenta III	35 c	20,59	35 35	20,56	35 34	− 0,000 01

Zusammenfassung.

Mit dem von *F. Pregl* und *M. de Crinis*[1]) zum Nachweis von Abwehrfermenten angegebenen Verfahren habe ich unter Versuchsbedingungen, die sich mir aus der Diskussion der Fehlerquellen[2]) ergeben hatten, nach der proteolytischen Wirkung des Schwangerenserums auf Placentaeiweiß gesucht. Bei der hier mitgeteilten Hauptversuchsreihe wurden mit 13 Seren von Schwangeren im siebenten bis zehnten lun. Monat 34 Untersuchungen angestellt, zu denen ich drei Placentapräparate als Substrate verwendete. In keinem einzigen Falle habe ich eine fermentative Auflösung des Substrats feststellen, noch eine solche durch den Vergleich der Schwangerschaftsversuche mit den entsprechenden Kontrollversuchen erschließen können.

Unter Hinweis auf die der Anwendung des Verfahrens vorangegangene Ermittelung seiner Fehlergrenzen und wegen des Umstandes, daß die durchgeführte statistische Auswertung des ganzen Beobachtungsmaterials auch innerhalb des Fehlerbereichs der einzelnen Versuche liegende Fermentwirkungen erfaßt haben würde, ist als Ergebnis zu verzeichnen, daß unter der

---

1) Siehe S. 492 Anmerkung 1.

2) Siehe S. 492 Anmerkung 4.

Einwirkung der untersuchten Schwangerenseren keine fermentative Auflösung der Placentapräparate stattgefunden hat, die mit der Methode hätte erfaßt werden können.

Dieses Ergebnis meiner Versuche steht in Widerspruch mit den günstigen Erfahrungen, die *Pregl* und *de Crinis* beim serologischen Schwangerschaftsnachweis mit der Methode gemacht haben. Als Erklärung hierfür scheinen mir zunächst folgende zwei Möglichkeiten in Betracht zu kommen: Entweder die Reproduzierbarkeit der Mikro-Abderhalden-Reaktion hängt von noch nicht aufgeklärten Umständen ab oder aber, es kommen spezifisch gegen Placenta eingestellte Serumfermente, wie sie die Lehre *Abderhaldens* fordert, in späteren Stadien der Schwangerschaft nicht regelmäßig vor.

Versuche über die Nachweisbarkeit immunisatorisch bedingter Fermentprozesse. II.

Von

Ernst Kupelwieser, Graz und H. Wastl, Wien.

(Eingegangen am 11. Januar 1924.)

Die der Erwartung nicht entsprechenden Erfahrungen, welche der eine von uns[1]) bei dem Versuche gemacht hatte, die serologische Schwangerschaftsreaktion mit der Refraktometermethode [„Mikro-Abderhalden-Reaktion"][2]) unter quantitativen Kautelen zu wiederholen, bestimmten uns, weitere Versuche dieser Art unter serologisch reineren und womöglich günstigeren Bedingungen anzustellen. Während man sich bei den Schwangerschaftsversuchen hinsichtlich der Vorbehandlung auf den im Einzelfalle nicht kontrollierbaren Übertritt von Placentaeiweiß ins mütterliche Blut verlassen mußte und das immunisatorisch wirksame Antigen der Natur der Sache nach ein arteigenes, nur *blut*fremdes sein konnte, sollten nunmehr im Tierversuche durch planmäßige Vorbehandlung mit *art*fremdem Eiweiß Immunseren gewonnen und mit diesen der Fermentnachweis versucht werden.

Es kam uns darauf an, Immunseren zu erzeugen, mit denen sich erfahrungsgemäß besonders deutliche Effekte im Sinne einer positiven „Abderhalden-Reaktion" erzielen lassen sollten. Wir griffen darum zurück auf die Untersuchungen von *H. Pfeiffer* und *S. Mita*[3]), die uns eine breite Erfahrungsgrundlage für die Gewinnung solcher Seren boten. *H. Pfeiffer* hatte[4]) im Laufe seiner Arbeiten über Anaphylaxie gefunden, daß nach parenteraler Zufuhr von artfremdem Eiweiß das Serum der vorbehandelten Tiere (Meerschweinchen) die Eigenschaft

---

[1]) *E. Kupelwieser*, diese Zeitschr. **145**, 492, 1924.

[2]) *F. Pregl* und *M. de Crinis*, Fermentforschung **2**, 58, 1917; quantitative Ausarbeitung der Methode bei *E. Kupelwieser*, diese Zeitschr. **131**, 413, 1922.

[3]) *H. Pfeiffer* und *S. Mita*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung **6**, 18, 1910.

[4]) *H. Pfeiffer*, Vortrag vom 25. November und vom 2. Dezember 1909, gehalten in der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie zu Graz.

gewinnt, mit dem Antigen der Vorbehandlung, und zwar nur mit diesem, in folgender Weise zu reagieren: Digerierte er ein Gemisch des Immunserums mit dem als Antigen verwendeten artfremden Serum, so traten in dem Gemisch inkoagulable Eiweißspaltprodukte auf, was er als Folge einer in spezifischer Weise ausgelösten Fermentreaktion deutete[1]). In der oben angeführten ausführlichen Arbeit mit *S. Mita* wird durch zahlreiche Versuche und entsprechende Kontrollen der Beweis für den regelmäßigen Eintritt dieser neuen Reaktion erbracht, und es werden unter anderem die für die Gewinnung besonders wirksamer Immunsera günstigen Bedingungen ermittelt: Als solche ergaben sich für das Meerschweinchen[2]) als Versuchstier hinsichtlich der Vorbehandlung die wiederholte intraperitoneale Einverleibung des Antigens in bestimmten Mengen und in bestimmten zeitlichen Abständen; ferner zeigte sich, daß Immunsera, die man im Stadium der Antianaphylaxie gewinnt, ganz besonders wirksam sind[3]).

Diese die Wahl des Versuchstieres und die Vorbehandlung betreffenden Vorschriften haben wir übernommen, da sie hochwirksame Seren zu gewinnen versprachen. Dagegen unterscheiden sich unsere im folgenden mitgeteilten Versuche wesentlich darin von denen der genannten Autoren, daß diese in einem Gemisch des Immunserums mit dem chemisch unveränderten Antigenserum nach dem Auftreten von Eiweißspaltprodukten fahndeten (Biuretreaktion nach Enteiweißung); wir aber suchten, indem wir mit der Refraktometermethode arbeiteten, nach der fermentativen Auflösung eines aus dem Antigenserum hergestellten festen Substrats im Immunserum. Da die von *E. Abderhalden* und seiner Schule für diese Immunitätsreaktion verantwortlich gemachten *spezifischen Fermente* auch feste Substrate anzugreifen imstande sein sollen, war im Sinne dieser Lehre zu erwarten, daß die von *H. Pfeiffer* und *S. Mita* für ihre Reaktion als besonders günstig gefundenen Bedingungen ebenso dem positiven Ausfall der Mikro-Abderhalden-Reaktion förderlich sein würden.

---

[1]) *E. Abderhalden*, der gleichzeitig und unabhängig auf anderem Wege zu ähnlichen Beobachtungen kam, hat die Lehre von den *spezifischen* Serumfermenten aufgestellt. Siehe *E. Abderhalden*, „Die *Abderhalden*sche Reaktion“, J. Springer, Berlin 1922, in welcher 5. Auflage der „Abwehrfermente“ *Abderhalden* diese von ihm seinerzeit gegebene Benennung wieder fallen und die Frage nach der Entstehung der Fermente offen läßt, wohl aber an ihrer Spezifität festhält. Erste Mitteilung seiner Beobachtungen: *E. Abderhalden* und *Pinkussohn*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **64**, 100, 1910 (eingegangen am 6. Dezember 1909).

[2]) Mit Immunseren von Kaninchen ließ sich die Reaktion nicht nachweisen.

[3]) Dies konnte *E. Zunz* und *P. György* (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **23**, 402, 1915) auch für den Hund als Versuchstier bestätigen.

Beschreibung der Versuche.

Die *Vorbehandlung* der Versuchstiere geschah in Befolgung der *Pfeiffer*schen Vorschriften wie folgt: Gesunden Meerschweinchen wurde an drei aufeinander folgenden Tagen je 1 ccm eines mit physiologischer Kochsalzlösung zum Hundertfachen seines Volumens verdünnten Rinderserums intraperitoneal injiziert. Um die Eigengiftigkeit des als Antigen angewandten Rinderserums herabzusetzen, wurde es vor dem Gebrauch 30 Minuten lang im Wasserbade bei einer Temperatur von + 56° C gehalten. 15 bis 21 Tage nach der letzten Injektion bekamen die Tiere abermals intraperitoneal 1,5 bis 2 ccm von dem unverdünnten, wie oben inaktivierten Rinderserum; 24 Stunden später wurde die Reinjektion wiederholt. Auf die erste Reinjektion reagierten die Tiere mit einem individuell etwas verschieden starken Temperaturabfall als Zeichen eines subletalen anaphylaktischen Schocks, der nach wenigen Stunden in Erholung überging. Auf die zweite Reinjektion reagierten die Tiere in typischen Fällen mit einer viel geringeren Temperaturänderung oder gar nicht.

Nur Tiere, die sich sicher in einem antianaphylaktischen Zustand befanden, wurden weiter verwendet und zum Zwecke der Serumgewinnung 5 bis 7 Tage nach der zweiten Reinjektion aus der Art. carotis unter aseptischen Kautelen entblutet. Die folgende Tabelle enthält die näheren Angaben über Vorbehandlung und Temperaturreaktion jener Tiere, deren Seren zur Untersuchung kamen:

Tabelle I.

Immuntier Nr.	Geschlecht	Anfangsgewicht g	Endgewicht g	Vorbehandlung	Intervall zwischen letzter Injektion u. 1. Reinjektion in Tagen	1. Reinjektion (inakt. Rinderserum intraperitoneal) ccm	Temperaturreaktion: Temperatur vor der 1. R.-I.	Temperaturreaktion: Tiefste Temp. nach der 1. R.-I.	2. R.-I. (24 Std. nach der 1. R.-I., sonst wie 1. R.-I.) ccm	Temperaturreaktion: Temperatur vor der 2. R.-I.	Temperaturreaktion: Temperatur nach der 2. R.-I.	Intervall von der 2. R.-I. bis zur Serumgewinnung in Tagen
I	♂	366	397	An 3 aufeinander folgenden Tagen je 0,01 ccm inaktiviertes Rinderserum intraperitoneal	17	2,0	38,5	35,5	2,0	38,8	37,7	7
II	♀	389	304		18	1,5	38,0	34,6	2,0	38,3	37,5	7½
III	♀	380	410		18	2,0	38,6	35,4	1,5	38,0	38,5	7½
IV	♂	345	395		19	2,0	38,2	35,0	2,0	39,0	39,5	7
V	♀	304	375		20	2,0	39,0	35,5	2,0	38,7	38,5	6½
VI	♂	209	330		21	2,0	39,0	31,5	2,0	39,2	39,2	6½
VII	♂	298	405		21	1,5	38,8	29,7	2,0	38,9	38,8	6½
VIII	♂	384	530		22	1,5	38,8	37,0	2,0	39,0	39,5	7
X	♀	362	340		17	2,0	38,9	36,8	2,0	39,2	39,0	6
XIV	♀	390	390		19	2,0	38,8	36,8	2,0	39,0	39,0	6
XV	♀	470	450		20	2,0	38,8	36,6	2,0	39,5	39,0	5
XVI	♀	460	500		20	2,0	39,0	37,0	2,0	38,4	38,5	6

Das zu untersuchende *Blut* wurde in sterilen Zentrifugierröhrchen aufgefangen und nach dem Eintritt der Gerinnung 10 Minuten lang zentrifugiert; dann wurde das Serum in ebenfalls sterile Probierröhrchen übertragen und wohlverschlossen sowie lichtgeschützt bei der Temperatur des fließenden Wasserleitungswassers (+ 8 bis + 10° C) bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt.

Als *Substrat* verwendeten wir ein aus Rinderserum nach der Methode *F. Pregls*[1]) hergestelltes Trockenpräparat; es ist das in der methodischen Vorarbeit des einen von uns[2]) mit „R.-Ser." bezeichnete Präparat. Seine Eigenschaften sind aus jener Arbeit zu ersehen (Spontane Löslichkeit: S. 434 ff., Tabelle XI; Abbaufähigkeit, mit Trypsin geprüft: S. 453, Tabelle XXVII und S. 471, Tabelle XXXVI). Vor Beginn der hier mitgeteilten Versuchsreihe wurde die Abbaufähigkeit des Präparates neuerdings mit Trypsin geprüft und erhalten gefunden.

Bezüglich der *Ausführung der Untersuchungen* können wir uns unter Hinweis auf die unmittelbar voranstehende erste Mitteilung[3]) noch kürzer fassen als dort: Je 0,01 g Substrat wurde auf $\pm$ 0,001 g genau in die Versuchsgläschen eingewogen, dann wurde siedende physiologische Kochsalzlösung zugesetzt und mit dieser blieben die Substrate eine halbe Stunde am Wasserbade (bei etwa $+$ 95° C) und mindestens ebenso lange bei Zimmertemperatur zum Quellen stehen. Hierauf wurde die Kochsalzlösung abgesaugt und zum gequollenen Substrat 0,5 ccm des zu untersuchenden Serums zugesetzt. Die so beschickten Gläschen kamen nun für 5 Minuten auf den Mischer, 5 Minuten später wurde nach kurzem Zentrifugieren die erste Probe (0,05 ccm) entnommen und in dieser der Brechungsindex des flüssigen Systemanteils bestimmt: „n_{D_1}".

(Es blieben also hier nach der Probeentnahme 0,45 ccm Systemflüssigkeit zurück. Eine Überschlagsrechnung zeigt, daß dabei Empfindlichkeit und Fehlerbereich der Untersuchung noch von gleicher Größenordnung bleiben wie bei Versuchen mit 0,5 ccm Systemflüssigkeit.)

Für die ganze Versuchsdauer kamen nun die Gläschen in ihren Haltern auf den Mischer, der etwa eine Umdrehung in der Minute machte. Die während des Versuches herrschende Zimmertemperatur ist für jeden Versuch in den Tabellen II und III angegeben. Am Ende des Versuches wurde in einer zweiten, nach kurzem Zentrifugieren dem Gläschen entnommenen Serumprobe neuerlich der Brechungsindex bestimmt: „n_{D_2}".

Die Bestimmung des Brechungsindex mit dem *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer (Nr. 13807 der Firma C. Zeiss) geschah in derselben Weise wie bei den in der ersten Mitteilung beschriebenen Versuchen mit Schwangerensera. Mit jedem Immunserum stellten wir vier Versuche an und untersuchten daneben eine Probe jedes Serums allein (ohne Substrat) unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die aus Serum und Substrat zusammengesetzten Reaktionssysteme. Zum Vergleich mit den Immunserumversuchen wurde eine Anzahl analoger Versuche mit dem Serum von unvorbehandelten Meerschweinchen ausgeführt.

Die folgende *tabellarische Zusammenstellung der Versuche* faßt in der Tabelle II die Versuche mit Normalseren, in der Tabelle III die Versuche mit den im antianaphylaktischen Stadium der Immuntiere gewonnenen Seren zusammen:

---

[1]) *F. Pregl*, Fermentforschung **1**, 7, 1914; die Herstellung von *Pregl*schen Trockenproteinen aus Serum hat *L. Löhner* (ebendaselbst **5**, 41, 1921) beschrieben.

[2]) *E. Kupelwieser*, diese Zeitschr. **131**, 413 (434), 1922.

[3]) *Derselbe*, ebendaselbst **145**, 492, 1924.

Ergebnis.

Wie man aus der letzten Spalte der Tabelle III ersieht, liegen die bei den Versuchen mit Immunserum + Substrat erhaltenen Ausschläge zwischen den Werten — 0,00006 und + 0,00012. Von derselben Größenordnung sind die Fehler, mit denen man bei Einhalten aller Vorsichtsmaßregeln, die sich aus der Diskussion der Fehlerquellen ergeben, zu rechnen hat[1]). Daher sind die Ergebnisse unserer einzelnen Untersuchungen hinsichtlich des Nachweises einer fermentativen Auflösung der Substrate als negativ zu bezeichnen.

Um etwa doch stattgehabte Fermentwirkungen zu erfassen, die wegen ihrer Geringfügigkeit im Fehlerbereich der einzelnen Untersuchungen verborgen geblieben wären, haben wir das vorliegende Beobachtungsmaterial statistisch ausgewertet in der gleichen Art, wie dies in der ersten Mitteilung geschehen ist[2]). Bezeichnen wir die Mittelwerte aus den Ergebnissen der Versuche mit Serum

[1]) Vgl. die voranstehende erste Mitteilung und die S. 508 unter Anmerkung 2 angeführte Arbeit.

[2]) Vgl. S. 499 und 502 der ersten Mitteilung.

Tabelle II.

Normalserum („N. S.“)	Blutentnahme	Zentrifugiert	Versuchsbeginn	Versuchsdauer	Versuchstemperatur °C	Temperatur d. Temperierbades bei der 1. n_D-Bestimm. °C	2. n_D-Bestimm. °C	Normalserumversuch Nr.	Skal.$_1$	n_{D_1}	Skal.$_2$	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
N. S. I	1. IV. 1923			23 St.	+17	+ 17,5		1	44,38	1,34440	44,58	1,34447	+ 0,000 07
♀	5^h p	5^h 30p	9^h p		17,17	± 0,05	± 0,05	2	44,19	433	44,06	428	— 0,000 05
N. S. II	14. IV. 1923			24 St.	+ 20	± 0,05	± 0,07	Serum-	46,35	1,34513	46,38	1,34514	+ 0,000 01
♂	10^h a	10^h50a	3^h 10p		20,21			allein	46,39	514	46,43	516	+ 0,000 02
								3	45,94	498	45,93	497	— 0,000 01
								4	45,60	485	45,54	483	— 0,000 02
								5	45,64	487	45,71	489	+ 0,000 02
								6	45,80	493	45,80	493	0,000 00
								7	45,80	493	45,87	495	+ 0,000 02
								8	45,77	491	45,84	494	+ 0,000 03
								9	45,71	489	45,73	490	+ 0,000 01
								10	45,97	499	46,08	503	+ 0,000 04

Tabelle III.

Immunserum („I. S.“)	Blutentnahme	Zentrifugiert	Versuchsbeginn	Versuchsdauer	Versuchstemperatur °C	Temperatur d. Temperierbades bei der 1. n_D-Bestimm. °C	2. n_D-Bestimm. °C	Immunserumversuch Nr.	Skal.₁	n_{D_1}	Skal.₂	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
I. S. I	6. IV. 1923					+ 17,5		Serum allein	47,06	1,34539	47,30	1,34548	+ 0,000 09
	3h p	3h 30 p	6h 20 p	24 St.	+ 18, 18, 17	± 0,1	± 0,05	1	46,14	505	46,06	502	— 0,000 03
								2	46,30	511	46,62	523	+ 0,000 12
								3	45,89	496	45,97	499	+ 0,000 03
								4	46,30	511	46,42	516	+ 0,000 05
I. S. II	7. IV. 1923							Serum allein	47,60	1,34560	47,56	1,34558	— 0,000 02
	10h a	10h30a	11h50a	24 St. 20 Min.	+ 18, 17, 18	± 0,03	± 0,05	5	46,71	526	46,67	525	— 0,000 01
								6	[47,59	559	46,94	535	— 0,000 24][1])
								7	46,82	530	46,89	533	+ 0,000 03
								8	46,83	531	46,94	535	+ 0,000 04
I. S. III	8. IV. 1923							Serum allein	45,57	1,34484	45,58	1,34484	0,000 00
	8h a	8h 20a	9h 20 a	24 St.	+ 17, 18, 16	± 0,05	± 0,1	9	44,88	459	44,80	456	— 0,000 03
								10	44,86	458	44,79	455	— 0,000 03
								11	44,86	459	45,09	466	+ 0,000 07
								12	44,56	447	44,45	443	— 0,000 04
I. S. IV	8. IV. 1923							Serum allein	46,29	1,34511	46,31	1,34511	0,000 00
	3h 30 p	4h p	5h 10 p	24 St.	+ 18, 16, 18	+ 0,05	± 0,05	13	45,89	496	45,90	496	0,000 00
								14	45,84	494	45,72	490	— 0,000 04
								15	46,08	503	46,09	503	0,000 00
								16	45,89	496	46,04	501	+ 0,000 05
I. S. V	9. IV. 1923							Serum allein	46,06	1,34502	46,19	1,34507	+ 0,000 05
	11h50a	12h30p	1h 30 p	25 St. 30 Min.	+ 17, 18, 18	± 0,03	± 0,05	17	45,32	475	45,29	474	— 0,000 01
								18	45,42	478	45,41	478	0,000 00
								19	45,42	478	45,44	479	+ 0,000 01
								20	45,40	481	45,61	486	+ 0,000 05

	10h a	10h30a	12h20p	24 St. 30 Min	+ 18, 18, 19	± 0,05	± 0,03	21	46,62	523	46,70	526	+ 0,000 03
								22	46,17	506	46,35	513	+ 0,000 07
								23	46,46	517	46,42	515	— 0,000 02
								24	46,62	523	46,56	521	— 0,000 02
I. S. VII	11. IV. 1923							Serum allein	45,09	1,34466	45,09	1,34466	0,000 00
	10h a	10h20a	10h40a	24 St.	+ 18, 20, 19	± 0,05	± 0,03	25	44,19	433	44,28	436	+ 0,000 03
								26	44,41	441	44,45	443	+ 0,000 02
								27	44,31	437	44,48	444	+ 0,000 07
								28	44,28	436	44,52	445	+ 0,000 09
I. S. VIII	12. IV. 1923							Serum allein	46,56	1,34521	46,66	1,34524	+ 0,000 03
	3h p	3h 30p	4h 50p	24 St. 15 Min.	+ 21, 19, 21	± 0,05	± 0,03	29	45,91	497	45,94	498	+ 0,000 01
								30	45,81	493	45,69	488	— 0,000 05
								31	45,89	496	45,95	498	+ 0,000 02
								32	45,72	490	45,60	485	— 0,000 05
I. S. X	13. IV. 1923							Serum allein	48,48	1,34593	48,59	1,34597	+ 0,0000 4
	10h a	10h30a	10h40a	24 St.	+ 19, 21, 19	± 0,03	± 0,05	33	47,69	563	47,80	567	+ 0,0000 4
								34	47,82	568	47,87	570	+ 0,0000 2
								35	47,59	559	47,67	562	+ 0,0000 3
								36	47,70	564	47,76	566	+ 0,0000 2
I. S. XIV	16. IV. 1923							Serum allein	45,23	1,34471	45,35	1,34476	+ 0,000 05
	10h a	10h50a	11h50a	23 St. 30 Min.	+ 20, 21, 20	± 0,05	± 0,05	37	44,53	446	44,53	446	0,000 00
								38	44,60	448	44,62	449	+ 0,000 01
								39	44,43	442	44,28	436	— 0,000 06
								40	44,40	441	44,38	440	— 0,000 01
I. S. XV	16. IV. 1923							Serum allein	47,50	1,34556	47,46	1,34554	— 0,000 02
	10h30a	10h50a	4h 10p	24 St.	+ 21, 20, 20	± 0,05	± 0,05	41	46,55	520	46,70	526	+ 0,000 06
								42	46,70	526	46,73	527	+ 0,000 01
								43	46,35	513	46,43	516	+ 0,000 03
								44	46,36	513	46,42	515	+ 0,000 02
I. S. XVI	18. IV. 1923							Serum allein	47,05	1,34539	47,16	1,34543	+ 0,000 04
	10h a	10h20a	10h50a	24 St.	+ 20, 21, 20	± 0,08	± 0,05	45	45,95	498	45,91	497	— 0,000 01
								46	45,75	491	45,83	494	+ 0,000 03
								47	45,91	497	45,81	493	— 0,000 04
								48	45,80	493	45,88	496	+ 0,000 03

[1]) Grober Fehler; offenbar unvollständige Mischung der Benetzungsflüssigkeit mit dem Serum vor der ersten Probeentnahme.

allein und der Versuche mit Normalserum bzw. mit Immunserum + Substrat wieder mit M_a, M_b bzw. M_c, so ergibt die Rechnung für diese Mittelwerte und deren wahrscheinliche Fehler:

$$M_a = +26 \cdot 10^{-6} \quad \pm 6 \cdot 10^{-6}$$
$$M_b = +11 \cdot 10^{-6} \quad \pm 7 \cdot 10^{-6}$$
$$M_c = +14 \cdot 10^{-6} \quad \pm 4 \cdot 10^{-6}$$ [1]).

M_a ist hier größer als die beiden anderen Mittelwerte, was mit Adsorptionsvorgängen zwischen Serum und Substrat zusammenhängen mag. Ausschlaggebend für die Frage nach einer Fermentwirkung aber ist es, daß M_b und M_c im Bereiche ihrer wahrscheinlichen Fehler übereinstimmen: Es hat also unter der Einwirkung der Immunseren eine fermentative Auflösung des Substrats auch nicht bis zu Ausschlägen von der Größenordnung der Mittelwertsfehler stattgefunden. (Durch eine Fermentwirkung bedingte Ausschläge von $+13 \cdot 10^{-6} = +0{,}000013$ wären selbst im ungünstigsten Falle an einer in positivem Sinne gerichteten, merklichen Verschiebung von M gegen M_b zu erkennen gewesen.)

Zusammenfassung.

Durch Vorbehandlung mit inaktiviertem Rinderserum wurden Meerschweinchen in einen auf dieses Antigen eingestellten Zustand der Antianaphylaxie versetzt und ihre in diesem Stadium gewonnenen Seren mit der Refraktometermethode [Mikro-Abderhalden-Reaktion][2]) hinsichtlich ihres gegen das Antigen der Vorbehandlung gerichteten proteolytischen Vermögens untersucht. Das Ergebnis der ganzen Versuchsreihe (12 Immunsera, 47 Versuche) war ein eindeutig negatives: Die erwartete Fermentwirkung konnte weder in den einzelnen Untersuchungen festgestellt werden, noch lieferte die statistische Auswertung des gesamten Beobachtungsmaterials, die auch im Fehlerbereich der einzelnen Untersuchung gelegene Fermentwirkungen erfaßt haben würde, den geringsten Anhaltspunkt für eine fermentative Auflösung des aus dem Rinderserum bereiteten festen Substrats unter der Einwirkung der Immunseren.

Dies ist um so auffallender, als nach den auf zahlreiche Versuche gestützten Erfahrungen von *H. Pfeiffer* das Serum antianaphylaktischer Meerschweinchen in hervorragendem Maße Träger einer proteolytischen Fermentwirkung ist, die beim Zusammentreffen dieses Immunserums

---

[1]) M_a ist gebildet aus den Resultaten der Serumkontrollen mit Normalserum, wie auch der mit Immunserum. Von den 48 Versuchen der Tabelle III ist Nr. 6 bei der Bildung von M_c ausgeschlossen worden, da dort offenbar ein grober Fehler vorliegt. Vgl. Anmerkung zu Tabelle III.

[2]) Siehe S. 505 Anmerkung 2.

mit dem Antigen der Vorbehandlung in vitro auftritt. Daß die bei der versuchten Schwangerschaftsreaktion erhobenen negativen Befunde[1]) sich nun unter schwerer wiegenden Umständen wiederholen, weist darauf hin, daß tiefere Gründe als das ausnahmsweise Mißlingen einer Versuchsreihe für das Versagen der Mikro-Abderhalden-Reaktion zu suchen sind. Man wird da an die von *H. Sachs*[2]) mit gewichtigen Gründen vertretene Anschauung zu denken haben, nach welcher der hier betrachtete Fermentprozeß — im Gegensatz zu *E. Abderhaldens* Lehre von den *spezifischen* (Abwehr-) Fermenten — für eine durch das Zusammentreffen des Immunserums mit dem Antigen in spezifischer Weise ausgelöste *unspezifische* Serumautolyse zu halten ist[3]). Ihr Auftreten wäre also geknüpft an die zwischen Immunserum und Antigen sich abspielende Eiweiß-Antieiweißreaktion, deren Zustandekommen bei den Versuchen von *H. Pfeiffer* und *S. Mita* dadurch sichergestellt war, daß sie das Antigen in unverändertem Zustande in ihr Reaktionssystem einführten; hingegen wird bei Verwendung des zu einem Trockenpräparate veränderten Antigens die Möglichkeit einer Eiweiß-Antieiweißreaktion zumindest in Frage gestellt, wenn nicht ausgeschlossen.

Diese Erwägung gab die Richtung an, nach welcher die Versuche weitergeführt werden.

---

[1]) Siehe S. 508 Anmerkung 3.

[2]) Zusammenfassende Darstellung: *H. Sachs*, Kolloid-Zeitschr. **24**, 113, 1919.

[3]) Auch *H. Pfeiffer* und *S. Mita* sprechen nie von *spezifischen Fermenten*, sondern vom Auftreten eines proteolytischen Fermentes, das beim Zusammentreffen des Immunserums mit dem Antigen der Vorbehandlung in *spezifischer Weise aktiviert* wird.

Über neue synthetisch dargestellte Nitrophenolglucoside nebst Beiträgen zur Desinfektionskraft und Giftigkeit der Nitrophenole.

Von

Erhard Glaser und Wilhelm Wulwek.

[Aus dem chemischen Laboratorium (des früheren Volksgesundheitsamtes) des jetzigen pharmakognostischen Universitätsinstituts in Wien.]

(Eingegangen am 11. Januar 1924.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Die Bedeutung der im Tier- und Pflanzenkörper entstehenden Phenole ist noch nicht genügend erkannt.

Sie werden als Index für Fäulnisprozesse (1) im Darme betrachtet. Von *Berthelot* (2) wurde aus Stühlen von Patienten ein Bacillus phenologenes isoliert, der sich durch die Fähigkeit, aus Tyrosin Phenol zu bilden, auszeichnet. Eine Methode zur Darstellung desselben aus der menschlichen und tierischen Darmflora wurde von ihm angegeben (3). Dadurch wurde ein genaueres Studium des Verhaltens der Phenole im Organismus schon eher ermöglicht. Nach Darmverschluß nehmen freie und Gesamtphenole zu. Durch wasserarme Ernährung wird die Ausscheidung von Phenolen gesteigert. *Rhein* (4) stellte fest, daß der Bacillus phenologenes auch aus p-Oxybenzoesäure Phenol abbauen kann. Diese Tatsache ist zweifellos wichtig für die intestinale Autointoxikation. Auch von anderen Bakterien ist bekannt, daß sie Phenol zu bilden vermögen. Derselbe Autor (5) konnte in Kulturen von Tetanus- und Pseudotetanusbazillen durch verschiedene Reaktionen Phenol nachweisen. Von *Bokorny* (6) konnte festgestellt werden, daß Phenole neben Formaldehyd, Oxybenzaldehyd, Essigsäure in geeigneter großer Verdünnung sogar für niedere Organismen als Nährstoff (Kohlenstoffquelle für Pilze) dienen können. *F. Werhuizen* (7) konnte aus Blättern des Coleus ambomitus Lonz in der aromatischen Riechstoffmenge desselben Carvacrol feststellen.

So sieht man im Tier- und Pflanzenkörper Phenole entstehen. Inwieweit Fermente dabei eine Rolle spielen, ist noch nicht durchsichtig. Nicht einmal der Mechanismus der Phenolasen ist ganz sicher. Zur Ausscheidung gelangen die Phenole als gepaarte Phenolderivate, von denen die Paarung mit der Glucuronsäure schon auf eine gewisse Affinität mit Glucose beim fermentativen Aufbau hinweist. Doch

geht nicht immer eine vermehrte Phenolbildung im Darme mit einer Vermehrung der Produktion der gepaarten Phenolderivate einher. Dies geschieht nach *Dubin* (8) bei Ausschluß der Galle vom Darme und dürfte in einer verminderten Verdauungsfähigkeit und einer herabgesetzten Hinderung der bakteriellen Tätigkeit zu suchen sein.

Noch weniger wissen wir in obigen Belangen vom *Nitrophenol*, obwohl die drei isomeren Verbindungen desselben chemisch genau untersucht sind. Von *E. Glaser* und *Prüfer* (9) wurde vor kurzem festgestellt, daß das Einführen einer Nitrogruppe in das Kresol die Desinfektionskraft desselben steigert, eine Erscheinung, die darauf zurückgeführt wurde, weil dadurch der Säurecharakter desselben erhöht ist. Bekanntlich weist auch Chlorphenol, wo der Säurecharakter des Phenols durch das Halogenatom verstärkt ist, ebenfalls eine größere bakterizide Wirkung auf. Es war also von Interesse, diese Verhältnisse auch beim Nitrophenol zu prüfen, und zwar um so mehr, als bei den durch die Einführung der Nitrogruppe ermöglichten Isomerien analog dem Verhalten des o-, m- und p-Kresols (10) eine verschiedene Giftigkeit zu erwarten sein wird.

Da die Giftwirkung des Kresols dem Phenol gegenüber geringer ist, so scheint die CH_3-Gruppe, welche das Kresol vom Phenol unterscheidet, die Giftwirkung desselben herabzusetzen. Ebenso die Giftwirkung herabsetzend, hat sich die Kuppelung des Zuckers an das Kresol in Form der ätherartigen Bindung des Kresolglucosides (9) erwiesen.

Diese Wirkung des Kresolglucosides wiederum ist ja nur als ein Pendant zu der vom Organismus bewirkten Unschädlichmachung der eingeführten bzw. im Körper entstehenden Phenole in Form der Ausscheidung derselben als gepaarte Phenolglucuronsäure anzusehen.

Bezüglich dieser haben ja schon *E. Salkowski* und *C. Neuberg* (11) nachgewiesen, daß sie als β-Phenolglucosid der d-Glucuronsäure zu betrachten ist; es wurde hierfür die Formel $C_{12}H_{14}O_7$ festgestellt.

Es war daher von Bedeutung, die entsprechenden, bisher nicht bekannten Glucoside der Nitrophenole herzustellen, da sich auch hier entsprechende Analogien, von denen besonders in physiologischer Hinsicht die bakterizide und die toxische weiter untersucht werden sollten, ergeben dürften. Bei der Darstellung mußte sich natürlich auch die Gelegenheit ergeben, das verschiedene chemische Verhalten dieser Produkte genauer zu studieren.

Experimenteller Teil.

Zur Darstellung der Glucoseacetylverbindung des o-, m- und p-Nitrophenols wurde der bei früheren Arbeiten (12) ähnlicher Art erprobte Gang eingehalten. Die isomeren Nitrophenolprodukte konnten leicht erhalten werden. Das aromatisch riechende, bei 45° schmelzende Orthonitrophenol

ist gelb, während das bei 114° schmelzende Paranitrophenol und das bei 96° schmelzende Metanitrophenol farblos sind. Die weiterhin noch notwendige Acetobromglucose wurde ebenfalls über die Pentaacetylglucose und Behandeln derselben mit Eisessigbromwasserstoff nach den diesbezüglichen Literaturangaben [*Koenig* und *Knorr*, *E. Fischer* (13)] in guter Ausbeute und rein gewonnen, wobei die auf Grund der oben erwähnten früheren Arbeiten (9 und 12) dabei erzielten Erfahrungen berücksichtigt und die gebotenen Vorsichten geübt wurden. Ebenso wurden bei der Synthese die durch die frühere Praxis im obigen Laboratorium bewährten Modifikationen der auch von *Mauthner* (14) bei der Herstellung der glucosidischen Bindungen der Oxyaldehyde gegebenen Vorschriften aufs neue bewährt gefunden.

Darstellung des Orthonitrophenolglucotetraacetats und Glucosids.

Zur Synthetisierung des Zwischenproduktes, des Orthonitrophenolglucotetraacetats wurden 3 g, 1, 2-Nitrophenol in einer Lösung von 1,2 g NaOH in 30 ccm Wasser aufgenommen und mit 6,3 g Acetobromglucose in 45 ccm Aceton gelöst, versetzt. Eine Temperaturerhöhung fand dabei nicht statt und es entstand immer eine homogene Mischung. Nach fünfstündigem Stehen wurde das Aceton im Vakuum bis zur Kristallausscheidung abgedunstet und der konzentrierte Lösungsrückstand hierauf mit 300 ccm Wasser versetzt, worauf sich, entsprechend der Unlöslichkeit des Zwischenproduktes in Wasser, reichlich Kristalle ausschieden, welche auf der Nutsche abfiltriert und mit Wasser bis zum Verschwinden der gelben Farbe gewaschen wurden. Aus heißem Alkohol umkristallisiert, resultierten farblose, lange Nadeln vom Schmelzpunkt 158 bis 159°, nämlich das Orthonitrophenolglucotetraacetat, welches in Alkohol, Methylalkohol (schwer), NH_3, Phenol, Chloroform und Aceton löslich war, sich dagegen in Wasser, Äther, Essigsäure und KOH nicht löste. Die Ausbeute betrug ungefähr 65 Proz. des verwendeten Nitrophenols.

Dieses Orthonitrophenolglucotetraacetat, welches entsprechend der Reaktion:

$$C_6H_4NO_2.OH + C_{14}H_{19}O_9Br + KOH = KBr + H_2O + C_{20}H_{23}O_{10}NO_2$$

oder

```
         O H     H O
         C           C6H7O5(CH3CO)4
    HC//  \CNO2
    HC\\  //CH
         C
         H
```

zustandegekommen ist, gab bei der vorgenommenen Elementaranalyse nachstehendes Resultat:

1. 0,1865 g Substanz: 0,3481 g CO_2 und 0,0837 g H_2O.
2. 0,1312 g Substanz: 0,2456 g CO_2 und 0,0594 g H_2O.

Bei der Stickstoffbestimmung (nach *Dumas*) ergaben:

1. 0,1575 g Substanz: 3,89 ccm N (18°, 746 mm)
2. 0,1502 g Substanz: 3,84 ccm N (19°, 745 mm)

$C_{20}H_{23}O_{12}N$.	Ber.:	C = 51,17,	H = 4,90,	N = 2,98 Proz.;
	gef.:	C = 50,88,	H = 4,98,	N = 2,84 „
		C = 50,99,	H = 5,03,	N = 2,93 „

Zur genaueren Untersuchung wurde noch die quantitative Bestimmung der Acetylgruppen nach der Methode von *Wenzl* (15) durchgeführt. Es wurde in verdünnter Schwefelsäure (3 : 2) verseift und zur Neutralisierung der überdestillierten Essigsäure 25 ccm KOH vom Titer 0,965 n/10 vorgelegt.

Hierbei wurden gefunden:

1. Bei 0,1865 g Substanz wurden zum Zurücktitrieren verbraucht 7,8 ccm HCl vom Titer 1,038 n/10.
2) Bei 0,1742 g Substanz wurden zum Zurücktitrieren verbraucht 8,9 ccm HCl vom Titer 1,038 n/10,

woraus sich ein Gehalt von Acetylgruppen für:

1. 4,04
2. 4,01

errechnet.

Hierauf wurde mit dem Orthonitrophenolglucotetraacetat noch die Molekulargewichtsbestimmung nach *Eijkmann* vorgenommen.

1. 0,162 g Substanz in 8,025 g Phenol gelöst, gaben eine $\Delta = 0{,}32^0$.
2. 0,1824 g Substanz in 8,552 g Phenol gelöst, gaben eine $\Delta = 0{,}33^0$.

Das Molekulargewicht wurde für:

$C_{20}H_{23}O_{12}N$ ber. = 469,
gef. = 454, 465.

Zur optischen Untersuchung wurden 0,1044 g Orthonitrophenolglucotetraacetat in 15 ccm Chloroform (spezifisches Gewicht desselben bei $18^0 = 1{,}469$, spezifisches Gewicht der Lösung = 1,4707) gelöst und im Halbnormalrohr polarisiert.

Die Drehung a betrug + 0,37°. Hiernach ist:

$$a\frac{18}{D} = \frac{100\,a}{1\,.\,p\,.\,d} = \frac{100\,.\,0{,}37}{1\,.\,0{,}696\,.\,1{,}4707} = +\,36{,}14^0.$$

E. Fischer und *Hermann Strauss* (16) haben bei der Darstellung des Tribromphenolglucosids bereits darauf hingewiesen, daß man um so vorsichtiger beim Behandeln mit Laugen oder alkalischen Erden sein muß, je mehr der mit Zucker verbundene Rest acylartigen Charakter annimmt. Es gelang ihnen nämlich das Verseifen desselben mit Baryt nicht. Da es sich hier um ein Mononitroderivat, demnach um einen weniger acylartigen Körper handelt, wurde hier ein Versuch mit Barytlauge gemacht. Jedoch auch hier mißglückte dies und es wurde das Orthonitrophenol zurückgewonnen.

Um zum Orthonitrophenolglucosid zu kommen, wurden 3 g feingepulvertes Tetraacetat in 225 ccm trockenen, frisch destillierten Methylalkohol suspendiert und in dasselbe nach dem Vorgange von *E. Fischer* (17) und seiner Mitarbeiter gasförmiges, über Natronkalk getrocknetes Ammoniakgas unter Eiskühlung bis zur vollkommenen Lösung eingeleitet, wozu ungefähr 1 Stunde erforderlich war. Die Lösung wurde hierauf 15 Stunden in Eis stehengelassen und im Vakuum bei 35° und 10 mm Druck auf ein Drittel des Volumens und weiterhin bei Zimmertemperatur eingeengt, wobei sich Kristalle abschieden, die abfiltriert, solange sie nicht ganz trocken waren, an der Luft zerflossen. Aus Wasser umkristallisiert, müssen sie gut und lange getrocknet werden, um beständig zu sein. Aus der Mutterlauge ließen sich noch weiter Kristalle gewinnen.

Die farblosen Kristalle haben einen Schmelzpunkt von 130 bis 131°, sind hygroskopisch, löslich in Wasser, Alkohol, Methylalkohol, Aceton, Essigsäure und KOH und sind unlöslich in Äther und Chloroform. Die Ausbeute betrug etwa 50 Proz. des verwendeten Glucotetraacetats.

Bei der Elementaranalyse für den Körper

$$\begin{array}{c} COC_6H_{11}O_5 \\ HC \diagup \diagdown CNO_2 \\ HC \diagdown \diagup CH \\ C \\ H \end{array} + H_2O \text{ oder } C_{12}H_{15}O_8N + H_2O$$

gaben:

1. 0,1405 g Substanz 0,2321 g CO_2, 0,0684 g H_2O,
2. 0,1572 g Substanz 0,2592 g CO_2, 0,0774 g H_2O.

Ber.:	C = 45,14,	H = 5,32	Proz.;
gef.:	C = 45,05,	H = 5,40	„
	C = 44,91,	H = 5,47	„

Da es aus dem Ergebnis der Verbrennungen hervorzugehen schien, daß das Glucosid mit einem Molekül H_2O kristallisiert, so wurde zum Nachweis desselben unter allen Kautelen eine Kristallwasserbestimmung vorgenommen:

1. 0,2042 g Substanz wurden im CO_2-Strom bei 100° getrocknet und erlitten dabei einen Gewichtsverlust von 0,011 g, was einem Prozentgehalt von 5,38 Proz. Wasser (berechnet 5,64 Proz.) entspricht.

Bei einer zweiten Einwage von 0,1921 g Substanz ergab sich ein Gewichtsverlust von 0,0107 g, das ist ein Prozentgehalt von 5,57.

Zur Bestätigung dieser Kristallwasserbestimmung wurde überdies die Elementaranalyse mit der wasserfrei gemachten Substanz vorgenommen.

1. 0,1920 g Substanz gaben 0,3358 g CO_2 und 0,0882 g H_2O,
2. 0,1511 g Substanz gaben 0,2645 g CO_2 und 0,0684 g H_2O,

Die Stickstoffbestimmungen nach *Dumas*, mit der wasserfreien Substanz vorgenommen, ergaben:

1. 0,1098 g Substanz: 4,4 ccm N (16°, 745 mm),
2. 0,1786 g Substanz: 7,06 ccm N (18°, 745 mm).

woraus sich

ber.:	C = 47,84,	H = 4,98,	N = 4,65	Proz.;
gef.:	C = 47,65,	H = 5,10,	N = 4,64	„
	C = 47,71,	H = 5,02,	N = 4,59	„

Alle diese Bestimmungen zeigten übereinstimmend 1 Mol Wasser an.

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mit der Gefrierpunktserniedrigung nach *Beckmann* durchgeführt:

1. 0,1501 g Substanz (wasserfrei), in 20 ccm Wasser gelöst, gaben eine $\Delta = 0,048°$.
2. 0,1821 g Substanz (wasserfrei), in 20 ccm Wasser gelöst, gaben eine $\Delta = 0,057°$.

Das Molekulargewicht ist für

$C_{12}H_{15}O_8N$ ber. = 301,
gef. = 289, 295.

Zur polarimetrischen Untersuchung wurden 0,1734 g der wasserhaltigen Substanz in 20 ccm Wasser gelöst. Bei 14° betrug das spezifische Gewicht des Wassers 0,9992, das der Lösung 1,004, die Drehung betrug — 0,72°, woraus sich ergibt:

$$[a]\frac{14}{D} = \frac{100 . a}{1 . p . d} = \frac{100 . 0,72}{1 . 0,867 . 1,004} = -82,72^{0}.$$

Zur Feststellung, ob es sich im vorliegenden Falle um ein β-Glucosid, wie anzunehmen ist, handelt, wurde noch die Spaltung mit Emulsin (18) nach der üblichen Weise vorgenommen. Es ergab sich nach der Spaltung eine Rechtsdrehung, die durch den abgespaltenen Zucker verursacht wurde. Sie betrug + 0,25° bei 14°.

Es liegt demnach ein β-Glucosid vor.

Darstellung des Metanitrophenolglucotetraacetats und des Metanitrophenolglucosids.

In ganz analoger Weise konnte das Metanitrophenolglucotetraacetat in kleinen farblosen Kristallen in sternförmigen Anordnungen vom Schmelzpunkt 136 bis 137° erhalten werden, welches sich leicht löslich in Alkohol, Methylalkohol, Aceton, Benzol, Chloroform und NH_3, dagegen unlöslich in Wasser, Äther, Petroläther, Amylalkohol, Essigsäure und KOH erwies.

Die Ausbeute betrug 60 Proz. des verwendeten Nitrophenols.

Die Elementaranalyse ergab nachstehendes Resultat:

1. 0,1433 g Substanz 0,2727 g CO_2, 0,0657 g H_2O.
2. 0,1235 g Substanz 0,231 g CO_2, 0,0567 g H_2O.

Bei der Stickstoffbestimmung nach *Dumas* gaben:

1. 0,1402 g Substanz: 3,51 N (16°, 745 mm).
2. 0,1521 g Substanz: 3,77 N (17°, 744 mm).

$C_{20}H_{23}O_{12}N$.	Ber.:	C = 51,12,	H = 4,90,	N = 2,98 Proz.;
	gef.:	C = 51,13,	H = 5,02,	N = 2,89 „
		C = 51,01,	H = 5,1,	N = 2,85 „

Bei der Acetylbestimmung nach *Wenzl* wurden von den vorgelegten 25 ccm KOH vom Titer 0,965 n/10 bei

1. 0,1643 g Substanz zum Zurücktitrieren verbraucht 9,7 ccm HCl vom Titer 1,038 n/10.
2. 0,1758 g Substanz zum Zurücktitrieren verbraucht 8,7 ccm HCl vom Titer 1,038 n/10,

woraus sich ein Gehalt von Acetylgruppen für:

1. 4,02
2. 4,04

errechnet.

Bei der Molekulargewichtsbestimmung nach *Eijkmann* gaben:

1. 0,1325 g Substanz, in 8,1212 g Phenol gelöst, Δ = 0,26°.
2. 0,2206 g Substanz, in 8,0025 g Phenol gelöst, Δ = 0,42°.

Ber. = 469,
gef. = 452, 472.

Bei der optischen Bestimmung betrug bei 0,1006 g Substanz, in 15 ccm Chloroform gelöst (spezifisches Gewicht desselben bei 18° 1,469; spezifisches Gewicht der Lösung 1,4705), die Drehung $a = -0{,}18^0$. Hiernach ist:

$$[a]\frac{18}{D} = \frac{100 \cdot 0{,}18}{1 \cdot 0{,}67 \cdot 1{,}4705} = -18{,}26^0.$$

Durch die auf dieselbe Weise vorgenommene Verseifung wurde das Metanitrophenolglucosid in farblosen, langen Nadeln vom Schmelzpunkt 167 bis 168° gewonnen. Von dem Orthoglucosid war es durch die Schnelligkeit der Verseifung unterscheidbar. Während beim Orthoglucosid fast 1 Stunde Ammoniak in die methylalkoholische Lösung eingeleitet werden muß, um das Orthoglucotetraacetat in Lösung zu bringen, geht das Metaglucotetraacetat schon nach 25 Minuten in Lösung. Weiter ist hier nicht so eine große Menge Methylalkohol zur Suspension nötig. Bei 3 g Acetat wurden 120 g Methylalkohol für genügend gefunden. In diesem Falle war auch die Vakuumdestillation bei 35° und 10 mm Druck wie beim Orthoglucosid nicht nötig. Die Nadeln waren löslich in Wasser, Alkohol, Methylalkohol, Phenol, Ammoniak und KOH, unlöslich in Äther, Benzol, Chloroform, Petroläther, Aceton und Essigsäure.

Die Ausbeute betrug 60 Proz. des verwendeten Glucotetraacetats.

Bei der Analyse gaben:

1. 0,1166 g Substanz 0,1935 g CO_2 und 0,0567 g H_2O.
2. 0,1297 g Substanz 0,2141 g CO_2 und 0,0639 g H_2O.

$C_{12}H_{15}O_8N + H_2O$. Ber.: C = 45,14, H = 5,32 Proz.;
gef.: C = 45,19, H = 5,40 „
C = 44,94, H = 5,47 „

Die Kristallwasserbestimmung bei 0,1707 g Substanz ergab einen Gewichtsverlust von 0,0099, was einem Wassergehalt von 5,8 Proz. entspricht. Bei einer weiteren Einwage von 0,2532 g Substanz betrug der Gewichtsverlust 0,0149 g, entsprechend einem Wassergehalt von 5,88 Proz. Berechnet wurde ein Wassergehalt = 5,64 Proz.

In Übereinstimmung mit diesem ebenfalls auf ein Molekül Wasser hindeutendes Resultat standen auch die Ergebnisse der mit der wasserfreien Substanz vorgenommenen Elementaranalysen.

1. 0,1753 g Substanz gaben 0,3069 g CO_2 und 0,081 g H_2O.
2. 0,1232 g Substanz gaben 0,2156 g CO_2 und 0,0576 g H_2O.

Die Stickstoffbestimmungen gaben:

1. 0,1603 g wasserfreie Substanz, Temperatur (t) = 18°, Barometerstand (b) = 743 mm, im Nitrometer = 6,43 ccm.
2. 0,1327 g wasserfreie Substanz (t = 17°, b = 743 mm), im Nitrometer 5,28 ccm.

$C_{12}H_{15}O_8N$. Ber.: C = 47,84, H = 4,98, N = 4,65 Proz.;
gef.: C = 47,74, H = 5,13, N = 4,60 „
C = 47,72, H = 5,19, N = 4,57 „

Bei der Molekulargewichtsbestimmung nach *Eijkmann* gaben:

1. 0,1515 g Substanz (wasserfrei), in 8,5572 g Phenol gelöst, eine $\Delta = 0{,}44^0$.
2. 0,1321 g Substanz (wasserfrei), in 8,121 g Phenol gelöst, eine $\Delta = 0{,}40^0$.

Ber. = 301,
gef. = 289, 293.

0,0989 g kristallwasserhaltige Substanz, in 20 ccm Wasser gelöst (spezifisches Gewicht desselben bei 22° 0,9978, spezifisches Gewicht der Lösung 1,0017), gaben bei der optischen Bestimmung eine Drehung $a = -0,42^\circ$, woraus

$$[a]\frac{22}{D} = \frac{100 \cdot 0,42}{1 \cdot 0,494 \cdot 1,0017} = -84,89^\circ$$

sich ergibt.

Auch hier handelt es sich um ein β-Glucosid, denn diese Lösung gab nach Spaltung mit Emulsin in der üblichen Weise eine Drehung nach rechts von $+ 0,12^\circ$ bei 22°. Diese Drehung wurde durch den abgespaltenen Zucker verursacht.

Darstellung des Paranitrophenolglucotetraacetats und des Paranitrophenolglucosids.

Auf dieselbe Weise, wie die beiden vorgenannten dargestellt, zeigte das Glucotetraacetat schöne Nadeln vom Schmelzpunkt 174 bis 175°, welche sich in Alkohol, Methylalkohol, Aceton, Äther, Chloroform, Benzol, Phenol und Ammoniak lösten, in Wasser, Amylalkohol, Petroläther, KOH unlöslich waren.

Die Ausbeute betrug 70 Proz. des verwendeten Paranitrophenols.

Das Ergebnis der Elementaranalyse ist:

1. 0,1255 g Substanz 0,2347 g CO_2 und 0,0567 g H_2O.
2. 0,1526 g Substanz 0,2866 g CO_2 und 0,0702 g H_2O.

Das Resultat der Stickstoffbestimmung ergab:

1. 0,1682 g Substanz ($t = 17^\circ$, $b = 745$ mm) im Nitrometer 4,14 ccm.
2. 0,1072 g Substanz ($t = 16^\circ$, $b = 743$ mm) im Nitrometer 2,87 ccm.

$C_{20}H_{23}O_{12}N$.	Ber.:	C = 51,17,	H = 4,90,	N = 2,98 Proz.;
	gef.:	C = 50,99,	H = 5,02,	N = 2,84 „
		C = 51,17,	H = 5,11,	N = 3,09 „

Bei der Acetylbestimmung nach *Wenzl* verbrauchten von den vorgelegten 25 ccm KOH vom Titer 0,965 n/10

1. 0,1438 g Substanz 11,4 ccm HCl vom Titer 1,038 n/10,
2. 0,1548 g Substanz 10,4 ccm HCl vom Titer 1,038 n/10,

woraus sich ein Gehalt von Acetylgruppen für

1. 4,02
2. 4,05

ergibt.

Die Molekulargewichtsbestimmung nach *Eijkmann* ergab:

1. 0,1702 g Substanz, in 8,1255 g Phenol gelöst, eine $\Delta = 0,33^\circ$.
2. 0,1725 g Substanz, in 8,535 g Phenol gelöst, eine $\Delta = 0,32^\circ$.

Ber. = 469,
gef. = 457, 455.

Bei der optischen Bestimmung ist bei 0,1689 g Substanz in 15 ccm Chloroform gelöst (spezifisches Gewicht desselben bei 18° 1,469, spezifisches Gewicht der Lösung = 1,471) die Drehung $a = -0,45^\circ$, woraus:

$$[a]\frac{18}{D} = \frac{100 \cdot 0,45.}{1 \cdot 1,126 \cdot 1,471} = -27,17^\circ$$

sich errechnet.

Das durch Verseifung auf die gewohnte Weise erhaltene Glucosid, aus heißem Wasser umkristallisiert, zeigte schöne nadelförmige Kristalle

mit einem Schmelzpunkt von 164 bis 165°, welche in Alkohol, Methylalkohol, Wasser, Ammoniak, KOH löslich, unlöslich in Äther, Aceton, Benzol, Chloroform, Petroläther, Amylalkohol und Phenol waren.

Die Ausbeute betrug 65 Proz. des verwendeten Glucotetraacetats.

Die Verseifung des Paranitrophenolglucotetraacetats ist sehr leicht vor sich gegangen. Für 3 g wurden 75 ccm Methylalkohol gebraucht. Schon ein kurzes Einleiten von NH_3 ergab eine vollständige Lösung unter Annahme einer gelben Farbe. Auch in diesem Falle wurde Ammoniak und Methylalkohol bei Zimmertemperatur im Vakuumexsikkator vertrieben, da die Kristallausscheidung schnell stattfindet.

Beim Verseifen ergab sich überdies die interessante Beobachtung, daß nach langem Stehen des verseiften Produktes in eiskalter Lösung sich Kristalle abscheiden, was auch beim Metaglucosid der Fall ist.

Bei Durchsicht der Literatur konnte festgestellt werden, daß schon *E. Fischer* (21) diese Erscheinung beobachten konnte und sie auf eine Verbindung zwischen dem Glucosid und Ammoniak zurückführte.

In der Löslichkeit unterscheidet es sich vom Metaglucosid durch seine Unlöslichkeit in Phenol.

Analysiert gaben:

1. 0,1623 g Substanz 0,2673 g CO_2 und 0,0783 g H_2O.
2. 0,0907 g Substanz 0,1499 g CO_2 und 0,045 g H_2O.

$C_{12}H_{15}O_8N + H_2O$. Ber.: C = 45,14, H = 5,32 Proz.;
gef.: C = 44,91, H = 5,36 „
C = 44,98, H = 5,51 „

Auch hier wurden Kristallwasserbestimmungen gemacht, wobei

1. 0,1712 g Substanz 0,0092 g Wasser verloren = 5,37 Proz. H_2O.
2. 0,2304 g Substanz 0,0126 g Wasser verloren = 5,46 Proz. H_2O.

Berechnet sind für 1 Mol. = 5,64 Proz.

In Übereinstimmung damit stehen die darauf vorgenommenen Verbrennungen mit der wasserfreien Substanz.

1. 0,1132 g Substanz gaben 0,198 g CO_2 und 0,0522 g H_2O.
2. 0,1502 g Substanz gaben 0,2629 g CO_2 und 0,0702 g H_2O.

Bei den Stickstoffbestimmungen ergaben sich:

1. bei 0,1355 g wasserfreier Substanz (t = 17°, b = 744 mm) im Nitrometer 5,35 ccm,
2. bei 0,1232 g wasserfreier Substanz (t = 17°, b = 743 mm) im Nitrometer 4,97 ccm.

$C_{12}H_{15}O_8N$. Ber.: C = 47,84, H = 4,98, N = 4,65 Proz.;
gef.: C = 47,70, H = 5,12, N = 4,55, „
C = 47,73, H = 5,19, N = 4,64 „

Bei der optischen Bestimmung ist bei 0,1134 g wasserhaltiger Substanz in 15 ccm Wasser gelöst (spezifisches Gewicht desselben bei 22° = 0,9978, spezifisches Gewicht der Lösung = 1,002), die Drehung $\alpha = -0{,}75°$.

$$[\alpha]\frac{22}{D} = \frac{100 \,.\, 0{,}75}{1 \,.\, 0{,}756 \,.\, 1{,}002} = -99°.$$

Nach der Spaltung mit Emulsin ergab sich eine Drehung von + 0,24°, die durch den abgespaltenen Zucker bewirkt wird.

Die chemische Ähnlichkeit der Phenole zeigt sich außer in ihrer Alkalilöslichkeit auch in ihrem gleichartigen Verhalten gegenüber gewissen

Reagenzien. Es soll nun das Verhalten unserer Produkte in dieser Beziehung kurz erwähnt werden.

Alkalische Kupfersulfatlösung wird von den Tetraacetaten sowohl wie von den Glucosiden erst nach dem Kochen mit Säuren reduziert. Auf Zusatz von verdünnter Eisenchloridlösung entstand bei den Tetraacetaten erst entsprechend der Abspaltung der Essigsäure eine blutrote Färbung. Mit *Millon*schem Reagens gaben die Tetraacetate keine Reaktion, die Glucoside bei Erwärmen eine schwach rosa Färbung. Die *Lex*sche Probe mit Chlorkalklösung und Ammoniak ist bei den Tetraacetaten negativ, die Glucoside zeigen jedoch beim Erwärmen eine grüne Färbung. Bei der *Liebermann*schen Reaktion mit Kaliumnitrit und konzentrierter Schwefelsäure gaben die Tetraacetate keine Färbung, die Glucoside färben sich beim Erwärmen schwach grün.

Die *Landoldt*sche Probe mit Bromwasser ist ebenfalls bei den Tetraacetaten negativ. Durch die Glucoside wird das Bromwasser zwar entfärbt, es entsteht aber kein Niederschlag. Mit Benzaldehyd und konzentrierter Schwefelsäure (*Melzer*sche Probe) geben sowohl die Tetraacetate wie auch die Glucoside keine Reaktion. Die von *Lutz* und *Baumé* (19) als für Nitrophenole charakteristisch beschriebene Rotfärbung mit Cyankalilösung trat auch beim Kochen weder bei den Tetraacetaten noch bei den Glucosiden auf.

Mit basischem und neutralem Bleiacetat gaben Tetraacetate und Glucoside keinen Niederschlag.

Sowohl Zwischen- als Endprodukte reagieren neutral.

Bezüglich der Löslichkeit der Nitrophenole haben schon *Nevil* (20), *Lidgwick*, *Spurell* und *David*, als sie behufs Feststellung der Konstitution die Löslichkeitskurven derselben mit o-, m- und p-Isomeren anderer Gruppen verglichen, festgestellt, daß das Orthonitrophenol von den Meta- und Pera-erheblich abweicht, was auf eine über den Stellungsunterschied hinausgehende Verschiedenheit hindeutet.

Durch die Einführung der Glucosegruppe verschwindet jedoch dieser Unterschied der Löslichkeit, da das Verhalten des Orthotetraacetats und -glucosids in bezug auf diese von den anderen Isomeren kaum nennenswert abweicht.

Besonders hervorgehoben muß jedoch in dieser Beziehung das polarimetrische Verhalten des Orthonitrophenolglucotetraacetats werden. Bekanntlich sind alle bis jetzt bestimmten, durch Emulsin spaltbare Glucoside linksdrehend und leiten sich von der d-Glucose ab. Es wurde ja das Emulsin von *Bourquelot* (18) als Reagens für den Nachweis einer ganzen Gruppe von Glucosiden der d-Glucose benutzt.

Abweichend davon dreht das Orthonitrophenolglucotetraacetat nach rechts, was wohl mit einer sterischen Beeinflussung durch die Orthostellung in Zusammenhang wird gebracht werden müssen. Durch die Art der Darstellung der Acetobromglucose ist es wohl ausgeschlossen, daß es sich ausnahmsweise um eine a-Acetobromglucose handelt; überdies dreht das Endprodukt, das Orthoglucosid, wiederum nach links; es müßte sich hier dann um einen der *Walden*schen Umkehrung analogen Vorgang handeln. Hier zeigt sich demnach, daß die Orthoverbindung gegenüber den beiden anderen eine Sonderstellung einnimmt.

Bei dieser Gelegenheit muß noch eines Umstandes Erwähnung getan werden.

Das Paranitrophenolglucosid, und zwar 0,1086 g, wurde in 15 ccm 10proz. Ammoniak gelöst, der Polarisation unterworfen und gab (spezifisches

Gewicht des 10proz. Ammoniaks = 0,9593, spezifisches Gewicht der Lösung = 0,9625 bei 14°) einen Drehungswinkel von $a = -0,54°$.

$$[a]\frac{14}{D} = \frac{100 . 0,54}{1 . 0,724 . 0,9625} = -77,49°.$$

Die Drehung ist also kleiner als die Drehung des Glucosids in wässeriger Lösung, welche — 99° betrug. Worauf ist das nun zurückzuführen?

Wie schon bemerkt, hat *E. Fischer* (21) beim Stehenlassen der mit Ammoniak verseiften methylalkoholischen Theophyllinglucosidlösung das Ausfallen von Kristallen beobachtet, die jedoch leicht wieder in Lösung gingen, und sprach dieselben für ihre Ammoniakverbindung an.

Bei der Nitrophenolglucosidverseifung mit Ammoniak in methylalkoholischer Lösung schieden sich ebenfalls beim langen Stehen in der Kälte Kristalle aus, die, abfiltriert, eine filzartige Masse ergaben. Sie wurden in Methylalkohol gelöst und die vereinigten Filtrate eingeengt, wobei das Glucosid resultierte.

Um ein derartiges Analogon wird es sich auch in dem Falle handeln. Vielleicht könnte diese Verbindung in dem Sinne aufgefaßt werden, daß es sich um eine Ammonsalzbindung der Nitrophenolglucoside handelt, wobei die Nitrogruppe Anlaß zur Bildung einer Pseudosäure geben würde.

Schon *A. Korczynski* (22) hat auf die Tendenz der Nitrophenole, mit Ammoniak normale Salze zu bilden, aufmerksam gemacht, allerdings schrieb er dieses Vermögen nur den Nitrophenolen zu, die gelbe Salze bilden, eine Eigenschaft, die jedoch nach unseren Beobachtungen allen Nitrophenolglucosiden zuzukommen scheint.

Das eigentümliche polarimetrische Verhalten in ammoniakalischer Lösung kann demnach als neuer Beweis dafür angesehen werden, daß es sich in diesem Falle um eine chemische Bindung des Ammoniaks mit den Nitrophenolglucosiden handelt.

Über die kristallographische Bestimmung der Nitrophenole liegen Untersuchungen von *Parker* (23) und ergänzende von *Steinmetz* (24) vor. Vom ersteren, rektifiziert nach *Steinmetz*, wurde angegeben, für Orthonitrophenol: monokline dünne Prismen 0,873: 1: (0,60 ?), $D^{14} = 1,484$, $\beta = 103°34'$; für m-Nitrophenol: monokline Tafeln nach der Basis 1,8446: 1 : ?, $\beta = 120°\ 21'$, schwache Doppelbrechung, vollkommen basale Spaltbarkeit, $D^{20} = 1,485$; Paranitrophenol; labile Modifikation: monokline kurze Prismen 0,3398: 1: 1,3836, $\beta = 106°\ 55'$, $D^{16} = 1,495$; stabile Modifikation: monokline kurze Prismen, 0,6549: 1:0,8416, $\beta = 53°24'30''$, sehr starke Doppelbrechung, vollkommen basale Spaltbarkeit, $D^{12} = 1,479$.

Es erschien daher von Belang, festzustellen, ob und wie über das Zwischenprodukt zu den Glucosiden bei den isomeren Verbindungen die Kristallform sich ändert.

Dr. *Köhler* vom mineralogisch-petrographischen Institut der Universität in Wien hat, wofür ihm an dieser Stelle der Dank ausgesprochen werden soll, diese Untersuchung vorgenommen, welche folgendes Resultat ergab:

Zwischenprodukte.

Paranitrophenolglucotetraacetat: Die gewöhnliche Form zeigt Abb. 1. Die Auslöschung nach der aufrechten Achse schwankt beträchtlich, da meistens mehrere Individuen übereinander gelagert sind. Wo scheinbar einfache Kristalle vorliegen, beträgt die Auslöschungsschiefe 10°.

Auf solchen Flächen kann man den zentralen Austritt der ersten Mittellinie α bemerken. Der Winkel $2\,V\alpha$ ist etwa 60°. Der Längsrichtung entspricht die Schwingungsrichtung des langsameren Strahles. Es würde also das monokline Kristallsystem, und zwar wegen des Drehungsvermögens die monokline sphenoidische Klasse vorliegen. Die Fläche, auf denen die Kristalle aufliegen, wäre dann als (010) aufzufassen. Dispersion, die in diesem Falle gedreht sein müßte, ist nicht zu beobachten. An den meisten scheinbar gleichfalls einfachen Kristallen sieht man ein einachsiges Interferenzbild am Rande des Gesichtsfeldes. Dies kann nur durch eine Zwillingsbildung erklärt werden, bei welcher die Achsenebenen gekreuzt werden, so daß ein einachsiges Interferenzbild zum Vorschein kommt. Im vorliegenden Falle könnte z. B. ein Querprisma Zwillingsebene sein. Wie Abb. 1 zeigt, treten am Kopfe der Säule Flächen auf, deren Winkel bei diesem Präparat 57° beträgt.

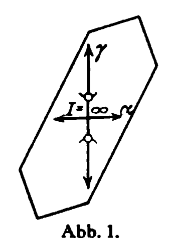


Abb. 1.
α rascherer Strahl.
γ langsamerer Strahl.

Metanitrophenolglucotetraacetat: Beim Präparat ist außer der Doppelbrechung keine optische Erscheinung wahrzunehmen, weil das Material von äußerst feiner Beschaffenheit ist. Vermutlich liegt die gleiche Kristallklasse wie beim Parazwischenprodukt vor.

Orthonitrophenolglucotetraacetat: Die Optik ist bei den Kristallen, die die Form der Abb. 1 zeigen, wie beim Parazwischenprodukt. Es gehört somit dem monoklinen System, und zwar der monoklin-sphenoidischen Klasse an. Der Winkel zwischen den beiden terminalen Begrenzungsflächen ist größer als beim Paratetraacetat. Er beträgt nämlich 77°.

Alle Kristalle sind farblos.

Endprodukte.

Paranitrophenolglucosid: Die Optik und die Kristallform der Endprodukte sind verschieden von denen der Zwischenprodukte. Die nadelig entwickelten Individuen zeigen rechteckigen Umriß. Andere Begrenzungen wurden nicht beobachtet. Die Auslöschung ist stets gerade, der Längsrichtung entspricht die Schwingungsrichtung des rascheren Strahles. An homogenen Stellen sieht man deutlich, den Austritt der spitzen Mittellinie. Der Achsenwinkel $2\,V\alpha$ beträgt etwa 60°. Alle Kristalle liegen auf derselben Fläche auf, die als (100) aufgefaßt werden können. Die Achsenebene ist somit || (010) (Abb. 2). Das optische Verhalten spricht für das rhombische Kristallsystem, wenngleich das monokline nicht völlig ausgeschlossen ist. Es wäre dann die Dispersion geneigt, was nicht beobachtet werden kann. Da die Substanz die Ebene des polarisierten Lichtes dreht, so kommt nur die bisphenoidische Klasse in Betracht. Parallel der (001) sieht man zahlreiche Schüppchen eingelagert, die eine Absonderung nach der Endfläche vortäuschen.

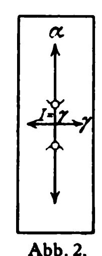


Abb. 2.
α rascherer Strahl.
γ langsamerer Strahl.

Metanitrophenolglucosid: Das Präparat ist so feinfaserig entwickelt, daß man keine Beobachtung an einem einzigen Individuum machen kann, da immer ein ganzes Bündel von parallel gestellten Fasern vorliegt. Die Auslöschung ist gerade, in der Längsrichtung schwingt α. Es dürfte auch in kristallographischer Richtung kein Unterschied gegen das Paraendprodukt vorhanden sein. Es gehört somit vermutlich dem rhombischen Kristallsystem, der rhombisch-bisphenoidischen Klasse an.

Orthonitrophenolglucosid: Soweit wegen der faserigen Beschaffenheit optische Untersuchungen zu einem Resultate führen, ist kein Unterschied gegen Para bemerkbar. Das Präparat gehört somit dem rhombischen Kristallsystem, nämlich der rhombisch-bisphenoidischen Klasse an. Die Umrisse der nadelig entwickelten Individuen zeigen rechteckige Kontur. (Abb. 2.) Die Auslöschung ist gerade. In der Längsrichtung schwingt der raschere Strahl. Die Einlagerungen nach der (001) fehlen.

Auch diese Präparate zeigen keine Färbung.

Während also die Zwischenprodukte noch dem monoklinen System angehören, gehören die Endprodukte, das sind die eigentlichen Glucoside, vermutlich der rhombisch-bisphenoidischen Klasse an. Auch in dem optischen Verhalten treten deutliche Änderungen auf. Von den Tetraacetaten zeigt das Paranitrophenolglucotetraacetat ein Interferenzbild, die beiden anderen nicht. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Isomeren weisen jedoch nicht direkt auf eine Sonderstellung eines derselben hin.

Wie bereits erwähnt, ist es gelungen (12), durch die Einführung der Nitrogruppe die desinfektorische Kraft des Kresols, von dem bekannt ist, daß es weniger giftig wirkt als das Phenol, zu steigern.

Wie verhält sich in dieser Beziehung das Nitrophenol und im besonderen, wie unterscheiden sich die drei Isomeren in ihrer bakteriziden Wirksamkeit? Besteht auch hier eine Analogie mit den Kresolen. bei denen das m-Kresol am meisten desinfizierend wirkt und am wenigsten giftig sich erwiesen hat?

Die Bakterizidie wurde nach der Methode der an sterile Seidenfäden angetrockneten Bakterien geprüft.

Zu diesem Behufe wurde eine 24stündige Agarkultur von einem resistenten Staphylococcus pyogenes citreus-Stamm mit steriler Kochsalzlösung abgespült und mit dieser Emulsion dicke, durch trockene Hitze sterilisierte Seidenfäden tüchtig durchtränkt und nach dem Herausnehmen in sterilen Petrischalen durch mehrere Stunden im Thermostaten bei 37° getrocknet.

Diese Seidenfäden wurden nun verschieden lange Zeit der Einwirkung der desinfizierenden Lösungen ausgesetzt und nach der Einwirkung durch 10 Minuten langes Einlegen in sterile physiologische Kochsalzlösung das anhaftende Desinfektionsmittel beseitigt. Hierauf wurden diese Seidenfäden in Peptonwasser verimpft und dadurch 48 Stunden im Brutschrank bei 37° bebrütet.

Beim Wachstum trat reichlich Trübung im Peptonwasserröhrchen auf. Selbstverständlich wurden jedesmal durch Verimpfen von Seidenfäden Kontrollen angestellt, ob die Bakterien noch lebensfähig sind, wie andererseits an den Grenzwerten noch Platten ausgegossen wurden, die mit drei Normalösen des betreffenden Peptonröhrchens beimpft worden sind.

Auf die Desinfektionskraft wurden geprüft: das p-, m-, o-Nitrophenol sowie ihre Glucoside, und zwar die beiden ersten Phenole in 0,65 proz. wässerigen, das ist einer m/21 Lösung.

Das Orthonitrophenol ist in Wasser unlöslich; es wurde daher von demselben eine 0,11 proz. Lösung in 32 proz. Alkohol das ist m/120 hergestellt.

Da aber einer 32proz. Alkohollösung ebenfalls eine desinfizierende Wirkung zukommt, wurde zum Vergleiche auch die Desinfektionskraft einer solchen geprüft.

Von den Glucosiden wurden wässerige, und zwar 0,42proz., das sind m/77 Lösungen hergestellt. Um einen Maßstab für die Desinfektionskraft zu bekommen, wurde die Widerstandsfähigkeit des Staphylokokkenstammes gleichzeitig an einer 3proz. und einer 1proz. Phenollösung bestimmt.

Das Ergebnis der Versuche ist in der Tabelle I niedergelegt.

Tabelle I.

Lösungen	10′	20′	30′	40′	50′	60′	70′	80′	90′	100′	110′	120′
1 proz. Phenol	+	+	+	+	++	+	—	—	—	—	—	—
3 „ „	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
0,65 „ Metanitrophenol	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
0,65 „ Paranitrophenol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
0,11 „ Orthonitrophenol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32 „ Alkohol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—+	+	+
0,42 proz. Glukoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\+ Bakterien lebensfähig (positiv).
— Bakterien abgetötet (negativ).

Werden die Zeiten auf einer Ordinate, die Prozente auf einer Abszisse aufgetragen, so kann die desinfizierende Wirkung der untersuchten Mittel in der Abb. 3 dargestellt werden.

Es geht aus den Untersuchungen mit Deutlichkeit hervor, daß, analog dem Verhalten der isomeren Kresolverbindungen, auch hier dem Meta-nitrophenol und ihren Isomeren die größte desinfizierende Kraft zukommt. Aus dem Umstande, daß dem Metanitrophenol in einer $^{2}/_{3}$proz. Lösung schon dieselbe Desinfektionskraft innewohnt wie dem 1proz. Phenol, kann auch hier wieder geschlossen werden, daß durch Einführen einer negativen Gruppe, hier einer Nitrogruppe, in das Phenol die Desinfektionskraft des letzteren gesteigert werden kann. Da dem 3-Nitrokresol, wie hier festgestellt werden konnte (12), in einer etwa sechsfach geringeren Dosierung fast dieselbe Desinfektionswirkung zukommt wie einer 1proz. Phenollösung, geht aus diesem Versuche auch wiederum hervor, daß die im Kresol enthaltene CH_3-Gruppe auch gegenüber dem Nitrophenol eine den Desinfektionseffekt sehr steigernde Wirkung verursacht.

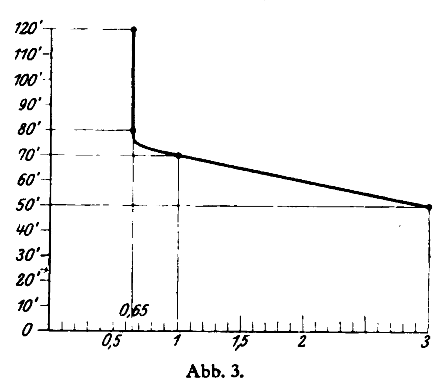


Abb. 3.

Mit Rücksicht auf die geringe Löslichkeit des Orthonitrophenols kann innerhalb der für Desinfektionsversuche praktisch möglichen Zeit von 1½ Stunden mit derselben eine desinfizierende Wirkung nicht erzielt werden.

Die Glucosidlösungen wirken, solange sie durch die Bakterien nicht gespalten waren, in den Kulturröhrchen direkt als nährstoffverbesserndes Mittel, indem durch dieselben das Wachstum in den Peptonröhrchen üppiger wurde. Die ätherartige Zuckerbindung des Glucosids wirkt also demnach aufhebend auf die bakterizide Eigenschaft des Nitrophenols.

Gelegentlich einer Arbeit über das 3-Nitrokresol (12) konnte auch festgestellt werden, daß dieses eine schädigende toxische Wirkung auf Fermente ausübt.

Es ist ferner bekannt, daß Bakterizidie und Toxizität durchaus nicht parallel gehen. Nach *Gadamer* (10) ist z. B. das am stärksten desinfizierende Metakresol unter ihren Isomeren am wenigsten giftig. *Bradshaw* (25) hat an einer ganzen Reihe von Ortho-, Meta- und Paraverbindungen, darunter bei den Nitrophenolen, die Oxydationsgeschwindigkeit bestimmt und hat dieselbe bei den Metaverbindungen am größten gefunden. Ob dieses damit in Zusammenhang gebracht werden kann, muß dahingestellt gelassen werden.

Es wurde deshalb auch hier untersucht, ob die isomeren Nitrophenolverbindungen in toxischer Beziehung den Kresolisomeren sich analog verhalten.

Zur Prüfung schien uns das eiweißverdauende Ferment des Magensaftes, das Pepsin, geeignet, und zwar deshalb, weil in der *Mett*schen Probe eine einfache Versuchsanordnung gegeben war. Die Probe wurde in der üblichen Weise vorgenommen. Glasröhrchen von 2 mm Lichtweite und 2 cm Länge wurden langsam in eine filtrierte Hühnereiweißlösung hineingleiten gelassen, wobei sorgsam darauf geachtet wurde, daß alle Luftbläschen aus denselben entwichen. Hierauf wurde das Gefäß mit den Röhrchen in ein kochendes Wasserbad gesetzt und 5 bis 10 Minuten kochen gelassen. Nach dem Abkühlen wurden die Röhrchen mit dem geronnenen Eiweiß in Glycerin aufbewahrt.

Für jede Probe wurde ein Röhrchen benutzt. Es wird zunächst mit Wasser abgewaschen und in eine Eprouvette gebracht, in welche immer je 1 ccm eines künstlichen konzentrierten Magensaftes gegeben wurde. Derselbe wurde auf die Weise hergestellt, daß 1 g Pepsin in 10 ccm n/10 HCl gelöst wurde, so daß also zu jedem Versuch 0,1 g Pepsin verwendet wurde. Vom p-, m-Nitrophenol wurden 1,3proz. wässerige, das sind m/11 Lösungen benutzt. Das Orthonitrophenol konnte nicht untersucht werden, da es in Wasser praktisch unlöslich und auch in 32proz. Alkohol nur wenig löslich ist. Überdies wirkt der Alkohol in dieser Konzentration bei 37° für sich allein schon hemmend. Es wären also Vergleichszahlen mit diesem nicht zu gewinnen gewesen.

Vorerst wurde das Optimum der Magensaftkonzentration festgestellt.

Zu diesem Zwecke wurden fünf Eprouvetten mit je 1 ccm des konzentrierten Magensaftes beschickt und die erste unverdünnt gelassen, während in die zweite 1 ccm, in die dritte 2 ccm, in die vierte 3 ccm und in die fünfte 4 ccm destillierten Wassers zugegeben wurden.

Nach 48 stündiger Verdauung im Brutschrank bei 37° ergibt sich das in nachstehender Tabelle niedergelegte Resultat.

Tabelle II.

Pepsin g	Konzentration der HCl Proz.	Wasser ccm	Verdautes Eiweiß mm
0,1	0,36	0	8
0,1	0,18	1	8
0,1	0,12	2	5
0,1	0,09	3	4,5
0,1	0,072	4	4,5

Die Verhältnisse sind in der Abb. 4 graphisch verzeichnet.

Die Abszisse gibt die Kubikzentimeter Wasser, somit auch die Konzentration der HCl, die Ordinate die verdaute Menge des Eiweißes in Millimetern an.

Auf Grund dieser Vorversuche wurden nun alle weiteren Versuche derart vorgenommen, daß immer eine Konzentration der HCl von 0,072 Proz. bzw. ein Gesamtvolumen von 5 ccm resultierte. Hierdurch war es möglich, durch das verhältnismäßig große Volumen die Nitrophenolzusätze hinreichend zu variieren, um sowohl Hemmung als auch völlige Vergiftung des Fermentes konstatieren zu können.

Das Verdauungsvermögen im Ausmaße von 4,5 mm (von beiden Seiten der *Mett*schen Röhre gemessen) genügt vollständig.

Abb. 4.

Bei den folgenden Versuchen wurde wie üblich Rücksicht genommen auf:

1. den zeitlichen Verlauf der Vergiftung,
2. den Zusammenhang zwischen Giftkonzentration und Wirkung,
3. die relative Giftigkeit der verschiedenen Mononitrophenole und
4. den Einfluß der Temperatur auf die Vergiftung.

Bei den Versuchen hat sich als empfehlenswert erwiesen, nach 48 Stunden abzulesen, da nach dieser Zeit erst brauchbare Resultate sich ergaben.

Zuerst wurde das Paranitrophenol untersucht und der Schwellenwert der Hemmung der Verdauung und der der Giftigkeit, das ist das Minimum an Gift, welches die Verdauung durch das Pepsin vollständig unterbindet, bestimmt.

Die Resultate der Versuche werden durch folgende Tabelle veranschaulicht.

Tabelle III.

Gesamtvolumen 5 ccm. Konzentration der HCl in Proz.	H_2O in ccm	Paranitrophenol ccm	Paranitrophenol g	Verdautes Eiweiß mm
0,072	3,7	0,3	0,0039	4
0,072	3,5	0,5	0,0065	3,5
0,072	3,3	0,7	0,0091	3
0,072	3	1	0,013	2,25
0,072	2,5	1,5	0,0195	1,1
0,072	2	2	0,026	0

Die Abb. 5, die dem Versuche entspricht, nimmt folgenden Verlauf, wobei die Abszisse die Kubikzentimeter des zugesetzten Nitrophenols, die Ordinate das verdaute Eiweiß in Millimetern bedeuten.

Der Schwellenwert der Hemmung der Verdauung findet sich demnach bei Zugabe von 0,3 ccm, das sind 0,0039 g, der Schwellenwert der Giftigkeit bei Zugabe von 2 ccm, das sind 0,026 g Paranitrophenol.

Beim Metanitrophenol ergaben sich nachstehende Verhältnisse.

Tabelle IV.

Gesamtvolumen 5 ccm. Konzentration der HCl in Proz.	H_2O in ccm	Metanitrophenol ccm	Metanitrophenol g	Verdautes Eiweiß mm
0,072	3,6	0,4	0,0052	4
0,072	3,5	0,5	0,0065	4
0,072	3	1	0,013	3,5
0,072	2,5	1,5	0,0195	2,25
0,072	2	2	0,026	1,1
0,072	1,5	2,5	0,0325	0

In einer Kurve (Abb. 6) graphisch verzeichnet, ergibt sich folgendes Bild.

Hier konnte der Schwellenwert der Hemmung der Verdauung erst bei 0,4 ccm, das sind 0,0052 g, der der Vergiftung des Pepsins bei 2,5 ccm, das sind 0,0325 g Metanitrophenol erreicht werden.

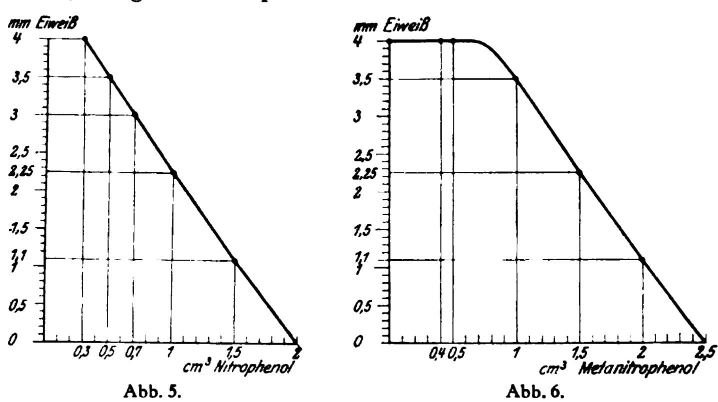


Abb. 5. Abb. 6.

Es wurden nun auch die Glucoside in derselben Weise untersucht. Das Resultat zeigt Tabelle *V*. Da sowohl das Para- wie Meta- und Ortho-

nitrophenolglucosid sich vollkommen gleich verhielten, so wird nur die Tabelle des Paranitrophenolglucosids wiedergegeben.

Tabelle V.

Gesamtvolumen 5 ccm. Konzentration der HCl in Proz.	H_2O in ccm	Glukoside		Verdautes Eiweiß mm
		ccm	g	
0,072	3	1	0,013	4,5
0,072	2,4	1,6	0,0208	4,25
0,072	2	2	0,026	4
0,072	1	3	0,039	4
0,072	0	4	0,052	4

Die graphische Darstellung ist aus der Abb. 7 ersichtlich.

Aus derselben geht hervor, daß die Glucoside gar keine Giftwirkung ausüben, was, wie eingangs bereits erwähnt wurde, darauf zurückzuführen ist, daß die ätherartige Bindung des Zuckers in den Glucosiden die Giftwirkung aufhebt; eine geringe hemmende Wirkung konnte beobachtet werden.

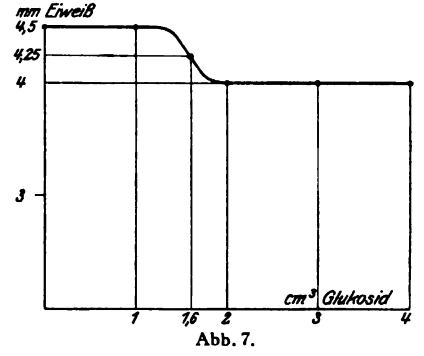


Abb. 7.

Die Giftwirkung tritt erst wieder auf, wenn, wie wir es beim Behandeln mit Emulsin gesehen haben, der Zucker abgespalten wird. Dies gibt sich kund durch die gelbe Farbe der Lösung, den Geruch und durch die Inversion.

Zum Vergleich wurde noch ein Giftigkeitsversuch mit 1- und 3proz. Phenol angestellt, der folgende Resultate ergab (Tabelle VI und VII).

Tabelle VI.

Gesamtvolumen 5 ccm. Konzentration der HCl in Proz.	H_2O in ccm	1 proz. Phenol		Verdautes Eiweiß mm
		ccm	g	
0,072	3	1	0,01	3
0,072	2	2	0,02	2,5
0,072	1	3	0,03	2,5
0,072	0	4	0,04	2

Tabelle VII.

Gesamtvolumen 5 ccm. Konzentration der HCl in Proz.	H_2O in ccm	3 proz. Phenol		Verdautes Eiweiß mm
		ccm	g	
0,072	2,5	1,5	0,045	2
0,072	2	2	0,06	1
0,072	1	3	0,09	0
0,072	0	4	0,12	0

Aus denselben geht hervor, daß nur bei dem 3 proz. Phenol innerhalb der geprüften Versuchsgrenzen der Schwellenwert der Giftwirkung erreicht werden konnte. Er tritt bei diesem durch Zugabe von 3 ccm, das ist 0,09 g Phenol ein.

Was den Einfluß der Temperatur auf die Giftwirkung anlangt, so wurde festgestellt, daß die Giftwirkung bei höherer Temperatur weniger zur Geltung kam, offenbar weil die Verdauung bei höherer Temperatur rasch vor sich geht, bevor noch die Giftwirkung des Nitrophenols einsetzen kann.

Wenn wir die Wirkungen des Para- und Metanitrophenols vergleichen, so ergibt sich die Giftwirkung des Paranitrophenols als stärker, wie die des Metanitrophenols. Dies steht in Einklang mit den Untersuchungen von *Peter Rona* und *Em. Bach* (26), die die Einwirkung dieser Phenole auf Invertase nach dem Beispiele von *Euler* und *Svanberg* studiert haben und zu demselben Resultate gelangten.

Wir haben also hier wieder ein Analogon mit Para- und Metakresol, indem das letztere wie hier das Metanitrophenol die geringste Giftwirkung aufweist, aber auch die stärkere bakterizide Wirkung zeigt.

Wichtig erscheint ferner, daß das Phenol weniger wirkt als das Nitrophenol; es übt offenbar die NO_2-Gruppe nicht nur eine erhöhte bakterizide Kraft aus, sondern es fällt ihr auch eine größere toxische Komponente zur Last. Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Giftwirkung wurde nicht untersucht, da *Rona* und *Bach* sowie *Euler* und *Svanberg* (27) einen solchen auf die Giftwirkung nicht feststellen konnten.

Zusammenfassung.

Aus vorstehenden Untersuchungen ergibt sich demnach, daß, abweichend von *E. Fischer* (28), der durch Erhitzen von Acetobromglucose mit Chinolin und überschüssigem Phenol Tetraacetate des α- und β-Phenolglucosids darstellte, durch Einwirkung von Acetobromglucose in Acetonlösung auf alkalische Nitrophenollösung sich über die Tetraacetate Nitrophenolglucoside unschwer in guter Ausbeute und in schönen farblosen Kristallen zu synthetisieren waren.

Es wurden auf diese Weise die Glucoacetate des Ortho- (Schmelzpunkt 158 bis 159°), des Meta- (Schmelzpunkt 136 bis 137°) und Paranitrophenols (Schmelzpunkt 174 bis 175°) und die Glucoside derselben: Ortho- (Schmelzpunkt 130 bis 131°), Meta- (Schmelzpunkt 167 bis 168°) und Paraglucoside (Schmelzpunkt 164 bis 165°) erhalten.

Die Glucoside kristallisieren sämtlich mit einem Molekül Wasser, welches bei 100° verloren geht.

Die Tetraacetate sowie die Glucoside weisen untereinander keinen bemerkenswerten Unterschied in der Löslichkeit auf. Die Tetraacetate unterscheiden sich jedoch von den Glucosiden durch die Unlöslichkeit in Wasser, wie durch die Löslichkeit in Chloroform.

Die Tetraacetate gehören wie die Nitrophenole dem monoklinen, die Glucoside dem rhombischen Kristallsystem an.

Von den Tetraacetaten drehen das Para- und Meta- nach links, das Orthoacetat jedoch nach rechts, was auf eine sterische Beeinflussung wird zurückgeführt werden müssen. Durch alle Nitrophenolglucoside dagegen wird die Schwingungsebene des polarisierten Lichtes nach links gedreht; durch Emulsin gespalten, drehen sie rechts, wie es bei den β-Glucosiden der Fall ist.

Mit Ammoniak bilden die Nitrophenolglucoside kristallinische Verbindungen, wofür ein neuer Beweis in der verminderten Drehung des Paraglucosids in ammoniakalischer Lösung erbracht wurde.

Bei der Prüfung der bakteriziden Kraft erwiesen sich die untersuchten Nitrophenole bedeutend stärker bakterizid als das Phenol, was auf die eingeführte NO_2-Gruppe zurückgeführt werden kann, welche gleich dem Chlor als negative Gruppe energischer desinfizierend wirkt. Von den Isomeren übt das Metanitrophenol die stärkste bakterizide Wirkung aus, was im Einklang steht mit dem Verhalten der isomeren Kresole, von welchen ebenfalls das Metakresol eine größere desinfizierende Kraft ausübt. Durch die Einführung der Nitrogruppe wurde aber der Desinfektionseffekt des Kresols nicht erreicht; offenbar steigert die in den Phenolkern eingeführte CH_3-Gruppe die Desinfektionswirkung desselben in einem viel größeren Maße, als es durch die NO_2-Gruppe bewirkt wird.

Den Glucosiden kommt keine desinfizierende Wirkung zu, ja sie üben, solange sie nicht gespalten sind, einen das Bakterienwachstum fördernden Einfluß aus.

Da die Löslichkeit der Nitrophenole in Wasser nur wenig über 1 Proz. hinausgeht, so kommen Nitrophenole für Desinfektionszwecke nur dort in Betracht, wo eine längere Einwirkungsdauer des Desinfektionsmittels möglich ist.

Was die Giftigkeit der Nitrophenole anlangt, konnte festgestellt werden, daß diese die der Phenole übersteigt. Es wird demnach die Giftigkeit durch die Einführung der Nitrogruppe erhöht.

Von den Isomeren erwies sich das am stärksten bakterizide Metanitrophenol als schwächer giftig als das Paranitrophenol; sie zeigten also wiederum ein ganz analoges Verhalten wie die isomeren Kresole, von denen ebenfalls das am stärksten desinfizierend wirkende Metakresol am wenigsten giftig ist.

Die Glucoside zeigten nur eine geringfügige Giftigkeit, was auf die ätherartige Bindung mit dem Zucker zurückgeführt werden kann. Dieses Verhalten findet sein Pendant im Organismus, wo eingeführte Phenole als gepaarte Glucuronsäuren, also als glucosidische Bindungen ausgeschieden werden.

In beiden Fällen handelt es sich um einen Entgiftungsprozeß.

Literatur.

1) *Harry Dubin*, Journ. of biol. Chem. **26**, 69, 91. — 2) *Albert Berthelot*, Annal. Inst. Pasteur **32**, H. 1. — 3) *Derselbe*, C. r. de l'Acad. des scienc. **164**, 196—197. — 4) *M. Rhein*, diese Zeitschr. **87**, H. 1/2, S. 123. — 5) *Derselbe*, C. r. Soc. de biol. **84**, 561. — 6) *Th. Bokorny*, Chem.-Ztg. **1906**, Nr. 30, S. 554. — 7) *F. Weihuizen*, Rec. trav. chim. **27**, H. 6, S. 355; Pharm. Weekblad **55**, 1470. — 8) *Harry Dubin*, Journ. of biol. Chem. **31**, 255. — 9) *E. Glaser* und *Prüfer*, diese Zeitschr. **136**, 1923. — 10) *Gadamer*, Lehrb. der chem. Toxicologie 1909, S. 324. — 11) *Salkowski* und *Neuberg*, diese Zeitschr. **2**, 307, 1907. — 12) *E. Glaser* und *M. Kraus*, *E. Glaser* und *S. Uiberall*, ebendaselbst **136**, 1923. — 13) *Koenigs* und *Knorr*, Berl. Ber. **34**, 161; *E. Fischer*, ebendaselbst **49**, 584; **44**, 1913. — 14) *Mauthner*, Journ. f. prakt. Chem., N. F. **85**, 769; **91**, 174; **82**, 271; **88**, 556; **85**, 564; **88**, 764. — 15) *Meyer*, Analyse und Konstitutionsbestimmung organischer Verbindungen 1916, S. 541. — 16) *E. Fischer* und *H. Strauss*, Berl. Ber. **45**, 2467, 1912. — 17) *E. Fischer* und *Helferich*, ebendaselbst **47**, 218; *Schneider*, *Clibbens*, *Hülweck* und *Steibelt*, ebendaselbst **47**, 1267; *E. Fischer*, ebendaselbst **47**, 1377 1381, 1379; *Schneider* und *Clibbens*, ebendaselbst **47**, 2221. — 18) *E. Bourquelot*, Arch. d. Pharm. **245**, 172. — 19) *L. Lutz* und *Baumé*, Bull. soc. pharm. **24**, 129—140. — 20) *Nevil*, *Vincent Lidgwick*, *William James Spurell* und *Thomas Ellis Davies*, Journ. chem. soc. London **107**, 1202. — 21) *E. Fischer* und *Burkhard Helferich*, Berl. Ber. **47**, 210. — 22) *A. Korczinsky*, Journ. de chem. Phys. **7**, 575. — 23) *The v. Parker*, Zeitschr. f. Kristallographie **44**, 154—161, 1907. — 24) *Steinmetz*, ebendaselbst **54**, 467—497. — 25) *Hamilton Bradshaw*, Amer. chem. Journ. **35**, 326. — 26) *Peter Rona* und *Emmerich Bach*, diese Zeitschr. **118**, 232. — 27) *Euler* und *Svanberg*, Fermentforschung **4**, 29, 1920. — 28) *E. Fischer* und *Lukas v. Mechel*, Berl. Ber. **49**, 2813.

Über die Nitrierung einiger Eiweißkörper. I.

Von

Fritz Lieben.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität in Wien.)

(Eingegangen am 11. Januar 1924.)

I. Einleitung.

Waser und *Lewandowsky*[1]) haben Tyrosin über Nitrotyrosin und Aminotyrosin durch Diazotieren des letzteren Stoffes in Dioxyphenylalanin übergeführt. Das Präparat war mit dem aus Vicia faba erhaltenen identisch. — Es war naheliegend und verlockend, den analogen Vorgang bei *Eiweißkörpern* zu studieren. Die vorliegende Arbeit ist das bisherige Ergebnis dieses Studiums.

Über die Nitrierung von Eiweißkörpern ist ziemlich viel gearbeitet worden. Wir finden die ältere Literatur, von *Fourcroy* und *Vauquelin* angefangen, bei *Fürth*[2]). Die älteste Angabe stammt nach *Habermann* und *Ehrenfeld*[3]) übrigens von *Hatchett* (Phil. Transact. 1799). Die Autoren waren sämtlich bemüht, durch mehr oder minder energische Einwirkung von HNO_3 aus dem Eiweißkomplex Stoffe zu isolieren und diese, so gut es ging, zu charakterisieren. Daß den dabei aus der Elementaranalyse abgeleiteten Formeln keinerlei Bedeutung zukommt, liegt auf der Hand. *Fürth* hat zunächst festgestellt, daß die Salpetersäureeinwirkung *keine einheitliche Reaktion vorstellt*, sondern daß stets eine Reihe „albumosenartiger", also niedriger molekularer Körper auftritt; auch hat er als erster versucht, die eingeführten NO_2-Gruppen nach dem Verfahren von *Limpricht*[4]) quantitativ zu bestimmen; er findet bei dem „Xanthoprotein" aus Casein 3,05 bis 3,33 Proz. NO_2. Bedeutsam ist auch sein Hinweis (S. 66), wonach „statt des Tyrosins als Spaltungsprodukt des Xanthoproteins ein gefärbtes, schwefelhaltiges Produkt, das Xanthomelanin, auftritt, welches bei Reduktion und weiterer Spaltung sich als ein Derivat des Indol liefernden Komplexes im Eiweißmolekül erkennen läßt und in naher Beziehung zu

---

[1]) *E. Waser* und *M. Lewandowsky*, Helv. chim. acta **4**, 657, 1921; C. 1922, **1**, 857.

[2]) *O. v. Fürth*, Über die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweißstoffe. Habilitationsschrift Straßburg 1899.

[3]) *J. Habermann* und *R. Ehrenfeld*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 231.

[4]) *Limpricht*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **11**, 35.

den Melaninen und dem Proteinchromogen steht". Hier ist jedenfalls schon angedeutet, daß bei der Nitrierung dem Tyrosin bzw. dem „indolliefernden" Tryptophankomplex (die letztere Aminosäure war damals noch nicht isoliert) eine wichtige Rolle zukommt. Die Einwirkung von starker HNO_3 auf Proteine hat *C. Th. Mörner* in einer Reihe von Arbeiten[1]) untersucht, er isolierte mehrere Reaktionsprodukte (Oxalsäure, Pikrinsäure, Benzoesäure, p-Nitrobenzoesäure, Terephthalsäure usw.) und suchte ihre Entstehung einzeln von den bekannten Aminosäuren abzuleiten. *Knoop*[2]) weist auf die mögliche Beteiligung von *Histidin* an den *Mörner*schen Reaktionen hin. Interessant ist die Arbeit von *Inouye*[3]); er erklärt die *aromatischen Eiweißbausteine* als maßgebend für die Xanthoproteinreaktion. Bei der Nitrierung von *Seidenfibroin* konnte er *Mononitrotyrosin* (neben farblosen Spaltprodukten) isolieren; er zitiert ferner frühere Arbeiten, in denen die Teilnahme von *Tryptophan* an der Xanthoproteinreaktion angenommen wird (*Salkowski*, *Rohde*, *Abderhalden* und *Kempe*). Gleichfalls mit dem Seidenfibroin als Objekt der Nitrierung hat sich *T. B. Johnson*[4]) in mehreren Arbeiten beschäftigt. Er hat ein Nitrofibroin dargestellt und dessen Verhalten gegen Reagenzien mit dem des Fibroins in einer Tabelle verglichen. Später zeigte er, daß das Nitrotyrosin *Inouyes* (l. c.) o-NO_2-Tyrosin der Formel

$$\overset{NO_2}{HO\langle\quad\rangle}-CH_2.CHNH_2COOH$$

ist, und daß *freies und in Proteinen gebundenes Tyrosin in gleicher Weise durch HNO_3 angegriffen werden*; der Eintritt der NO_2-Gruppe erfolgt in Orthostelle zur Phenol-(Hydroxyl-)gruppe. Schließlich sei noch an dieser Stelle eine spätere Arbeit von *Mörner*[5]) erwähnt, in der die Färbungen, die Tyrosin und Tryptophan nach HNO_3-Einwirkung (n/20) in saurer und alkalischer Lösung liefern, kolorimetrisch verglichen wird. Die Lösungen wurden dabei 3 Minuten am Wasserbade erwärmt.

Die angeführten Arbeiten zeigen sämtlich, daß bei der Nitrierung von Eiweißkörpern dem *Tyrosin* und wahrscheinlich auch dem *Tryptophan* eine führende Rolle zukommen dürfte. Doch fehlt es bisher an einer verläßlichen quantitativen Bestimmung der vom Eiweiß aufgenommenen NO_2-Gruppen; daher fehlt es auch an bestimmten Anhaltspunkten dafür, ob *nur* das Tyrosin und eventuell noch das Tryptophan NO_2-Gruppen aufnehmen können, oder ob dafür auch andere Aminosäuren in Betracht kommen; schließlich ist das Ausmaß der Nitrierung (Mono-, Dinitrierung usw.) naturgemäß unbekannt, speziell in seiner eventuellen Abhängigkeit von der Konzentration der angewendeten HNO_3. Es war also mein Bestreben, vor allem zu einer *Regel für den*

---

[1]) *C. Th. Mörner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **95**, 263; **98**, 89, 93 und 97; **101**, 15.

[2]) *F. Knoop*, ebendaselbst **101**, 210.

[3]) *K. Inouye*, ebendaselbst 81, 80.

[4]) *T. B. Johnson* und Mitarbeiter, Journ. Amer. Chem. Soc. **37**, 2170 und 2598, 1915; C. 1916, **1**, 147; C. 1916, **1**, 469.

[5]) *C. Th. Mörner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **107**, 203, 1919.

Verlauf der Nitrierung bei Proteinen zu gelangen, diese Möglichkeit hing offenbar von zwei Faktoren ab: 1. wie schon erwähnt, von einer verläßlichen NO_2-Bestimmungsmethode, und 2. einer ausreichenden Kenntnis des Aminosäuregehaltes, vor allem des Gehaltes von Tyrosin und Tryptophan bei einigen wichtigen Proteinen. Die diversen Bestimmungsmethoden für diese zwei Aminosäuren liefern allerdings bis jetzt noch keineswegs sichergestellte, untereinander übereinstimmende Resultate.

II. Nitrierung von Seidenfibroin.

Es lag nahe, als erstes Objekt der Nitrierung das schon von *Inouye* (l. c.) und *Johnson* (l. c.) verwendete *Seidenfibroin* heranzuziehen, und zwar 1., weil sein Gehalt an Tyrosin ziemlich übereinstimmend[1]), als zwischen 10,5 und 11 Proz. liegend angegeben wird, und 2., weil dieses Produkt frei von Tryptophan ist, was für die erste Orientierung erwünscht war.

Das Fibroin wurde nach dem Verfahren von *Emil Fischer* und *Skita*[2]) aus Rohseide durch Erhitzen derselben mit Wasser auf etwa 120° im Autoklaven bereitet; das Wasser wurde dreimal erneuert; das Fibroin wurde dann auf der Nutsche abgepreßt und der Vorschrift entsprechend ausgewaschen, schließlich getrocknet. 20 g Fibroin wurden mit 0,5 Liter 20proz. HNO_3 (die konzentrierte Säure dreifach verdünnt), wie sie *Johnson* verwendet hatte, übergossen und über Nacht stehen gelassen. Das Fibroin färbt sich alsbald gelb, ebenso die Salpetersäure; am nächsten Tage wurde auf der Nutsche (ohne Filter) abgepreßt und mit Wasser so lange nachgewaschen, bis im Waschwasser mit $FeSO_4$ und konzentrierter H_2SO_4 *keine Spur* von HNO_3 mehr nachzuweisen war. Das so erhaltene gelbe *Nitrofibroin* wird von H_2O, Alkohol und verdünnter HCl nicht gelöst, löst sich in konzentrierter HCl schon zum Teil in der Kälte, vollständig in der Wärme, färbt sich mit NaOH (ähnlich mit NH_3) unter Quellung gelbrot (Xanthoproteinreaktion), und liefert schließlich *keine* Färbung mit *Millon*schem Reagens. Ausbeute 19,3 g von 20 g Fibroin.

III. Bestimmung der Nitrogruppe.

Die zu wählende Methode der NO_2-Bestimmung war vor ihrer Anwendung auf Eiweißkörper natürlich an bekannten Nitrokörpern zu erproben. Zuerst wurde die schon erwähnte Methode vom *Limpricht* (l. c.) (nach der Beschreibung von *H. Meyer*, Analyse und Konstitutions-

---

[1]) Vgl. *O. Fürth* und *W. Fleischmann*, diese Zeitschr. **127**, 137, speziell die Tabelle S. 147 und die Zahlen für Fibroin S. 148.

[2]) *E. Fischer* und *A. Skita*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 177.

ermittlung organischer Verbindungen, 3. Aufl., 1916, S. 916f.) angewendet, und zwar bei Nitrophenol, Nitrosalicylsäure, Pikrinsäure und Pikrolonsäure; es gelang mir aber nicht (auch nicht bei Verwendung von n/10 $KMnO_4$ statt n/10 J), zu einem *scharfen* Umschlag zu kommen. Der scharfe Umschlag konnte auch nicht wahrgenommen werden, wenn die „Sodalösung" *Limprichts* (Na_2CO_3 + Seignettesalz) nach *Florentin* und *Vandenberghe*[1]) durch $CaCO_3$ + Ammoniumcitrat ersetzt wurde. Hingegen gelangen die Bestimmungen nach der von *Desvergnes*[2]) modifizierten Methode von *Young* und *Swain* (C. 1897, II, S. 1162).

Ich ging schließlich folgendermaßen vor: Der Nitrokörper wird in der Wärme in Alkohol gelöst, indes gleichzeitig CO_2 aus einem *Kipp*schen Apparat in langsamem Strome durch die Lösung geleitet wird. Dieser Vorgang geht in einem Kölbchen mit doppelt gebohrtem Gummistopfen vor sich; die eine Bohrung ist für den Rückflußkühler, die zweite für das CO_2-Einleitungsrohr bestimmt, das bis zum Boden des Kölbchens reicht. Nach erfolgter Lösung wird durch den Kühler ein berechneter Überschuß der Zinnchlorür-HCl-Lösung nach *Limpricht* (s. *Meyers* Buch, l. c., S. 916) zugesetzt, von der letzteren wird 1 ccm auf n/10 Jodlösung gestellt, und zwar muß diese Einstellung vor jedem Versuche von neuem erfolgen, da der Titer der Zinnchlorür-HCl-Lösung Tag für Tag langsam abnimmt. 1 ccm n/10 J entspricht: 0,0059 g Sn bzw. **0,0007655 g NO_2**. Es wird noch konzentrierte HCl zugeführt, durch Nachspülen mit verdünnter HCl dafür gesorgt, daß nichts von der Zinnchlorürlösung im Kühler zurückbleibt und durch 1½ bis 2 Stunden die Lösung unter fortwährendem CO_2-Durchleiten weiter gekocht; dann wird die Flamme abgedreht und *im CO_2-Strome erkalten gelassen;* das Erkalten dauert je nach dem Flüssigkeitsvolumen ½ bis ¾ Stunden. Die Lösung wird dann quantitativ in einen 200-ccm-Meßkolben gebracht, mit H_2O aufgefüllt, gut durchgemischt und 20 ccm (= $^1/_{10}$) der Lösung mit n/10 Jod und Stärke zum *scharfen Farbenumschlag* titriert. Die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter n/10 J wird von der Anzahl Kubikzentimeter n/10 J abgezogen, die der zugesetzten Menge $SnCl_2$ entspricht, und die Differenz (i. e. die während der Reaktion verbrauchte Menge $SnCl_2$) durch Multiplikation mit dem Faktor (F) = 0,0007655 auf NO_2-Werte umgerechnet. Ich habe die (konzentriertere) $SnCl_2$-Lösung von *Limpricht* beibehalten und zum Lösen des Nitrokörpers mit Vorteil nur *sehr wenig* Alkohol verwendet. Die heiße Lösung *muß* im CO_2-Strome und nicht an der Luft erkalten, da sonst die heiße $SnCl_2$-Lösung oxydiert wird und man

---

[1]) *Florentin* und *Vandenberghe*, Bull. soc. Chem. (4) 27, 158, 1920; C. 1920, 2, 751.

[2]) *L. Desvergnes*, Ann. Chim. Analyt. appl. (2) 2, 141, 1920; C. 1920, 4, 310 (vgl. auch *J. H. F. Druce*, C. 1920, 2, 751).

zu hohe Werte findet. Die gefundenen Werte liegen im allgemeinen zwischen 90 und 100 Proz. der Theorie. Z. B.:

0,2101 g p-NO_2-Phenol werden in wenig Alkohol gelöst; dann 15 ccm $SnCl_2$-Lösung, 30 ccm konzentrierte HCl und etwas verdünnte HCl zugeführt; es wird im CO_2-Strome 2 Stunden gekocht, dann erkalten gelassen: 1 ccm $SnCl_2$ entsprach 11,5 ccm n/10 J, 15 ccm $SnCl_2$ daher 172,5 ccm n/10 J, es wurden verbraucht für 20 ccm Lösung 8,7 ccm n/10 J, daher für 200 ccm Lösung 87,0 ccm n/10 J.

172,5 − 87,0 = 85,5 n/10 J × F = 0,0654 g NO_2, gegen **0,0696 g NO_2** berechnet (etwa 94 Proz.).

So ergaben:

0,2080 g Pikrolonsäure . .	0,0711 g 0,0689 g	NO_2 statt ber. 0,0725 g i. e.	98 Proz. 95 Proz.
0,2091 g p-NO_2-Anisol . . .	0,0570 g 0,0582 g	NO_2 statt ber. 0,0629 g i. e.	90,6 Proz. 92,5 Proz.
0,2048 g 1,3-Dinitrobenzol	0,1017 g	NO_2 berechn. 0,1121 g i. e.	90,8 Proz.
0,2045 g Pikrinsäure . . .	0,1149 g	NO_2 berechn. 0,1232 g i. e.	92,5 Proz.
0,2170 g o-NO_2-Phenol . .	0,0719 g	NO_2 berechn. 0,0718 g i. e.	100 Proz.

IV. Bestimmung der NO_2-Gruppen im Nitrofibroin.

1. Das nach II. dargestellte Nitrofibroin wurde nunmehr dem eben geschilderten Verfahren unterzogen. Die Auflösung der Substanz erfolgte dabei in konzentrierter HCl (ohne Alkohol). Die *Reinheit* der konzentrierten HCl ist für den Zweck von größter Wichtigkeit (Verunreinigungen wie $FeCl_3$ können natürlich oxydierend wirken).

Z. B. 1,9245 g Nitrofibroin wurden in etwa 45 ccm konzentrierter HCl in der Wärme gelöst, dann Zusatz von 30 ccm $SnCl_2$ usw. wie oben:

30 ccm $SnCl_2$ (à 9 ccm n/10 J): 270 ccm n/10 J
es wurden zurücktitriert im ganzen: 212 ccm
58 ccm

58 ccm n/10 J × F = **0,0444** g NO_2
analog liefern 2,0154 g Nitrofibroin = **0,0465** g „

Die theoretische Berechnung erfolgt auf Grund der folgenden Überlegung; der Tyrosingehalt des Fibroins wurde zunächst zu 10 Proz. angenommen; ferner wurde vorausgesetzt, daß durch das Stehen in 21 proz. HNO_3 die prozentische Zusammensetzung des Nitrofibroins gegenüber der des Fibroins nicht wesentlich geändert wird (vgl. Abschnitt IX).

100 g Fibroin enthalten 10 g Tyrosin, 10 g Tyrosin liefern bei der einfachen Nitrierung 12,5 g Nitrotyrosin; daher enthalten 102,5 g Nitrofibroin 12,5 g, also enthalten z. B. 1,9245 g Nitrofibroin 0,2347 g Nitrotyrosin.

Es verhält sich
Nitrotyrosin : NO_2 = 226 : 46 = 0,2347 : x, x = **0,0478 g NO_2** berechnet, gegen 0,0444 g NO_2 gefunden (etwa 93 Proz.).

Ebenso enthalten 2,0154 g Nitrofibroin:
0,2458 g Nitrotyrosin bzw. **0,0489 g NO_2** berechnet, gegen **0,0465 g NO_2** gefunden (etwa 93 Proz.).

Der berechnete Wert wird natürlich höher, wenn wir einen Tyrosingehalt von 11 Proz. für Fibroin zugrunde legen:

0,0515 g NO_2 bzw. 0,0540 g NO_2 ber.
gegen 0,0444 g „ „ 0,0465 g „ gef. (etwa 86 Proz.).

Die Übereinstimmung ist, zumal später (s. unten) höhere Werte gefunden wurden, eine so weit gute, daß der Schluß berechtigt erschien: *die Nitrierung von Fibroin mit HNO_3 (21proz.) verläuft so, daß nur das darin enthaltene Tyrosin, und zwar einfach, nitriert wird.* Ich habe mich natürlich davon überzeugt, daß der „NO_2-Wert" des Fibroins selbst sich in den Fehlergrenzen hält.

2. Von Interesse war das Ergebnis der *Nitrobestimmung nach Hydrolyse mit konzentriertem HCl.* Es wurden 2,05 g Nitrofibroin mit 50 ccm konzentriertem HCl (40proz.) etwa 8½ Stunden am Rückflußkühler gekocht; die NO_2-Bestimmung ergab 0,037 g NO_2 statt 0,051 g ber. (i. e. etwa 72 Proz.). Die Lösung färbt sich beim Kochen dunkel, so daß an partielle Bildung des *Gortner*schen „säurelöslichen Humins" auf Kosten des Nitrotyrosins zu denken wäre, wenn auch das Verhalten von Nitrotyrosin dem von Tyrosin keineswegs analog sein müßte; ein weiterer Versuch gab für 2,01 g Nitrofibroin: 0,038 g NO_2 statt 0,050 g ber. (i. e. etwa 75 Proz.). — Um die Möglichkeit auszuschließen, daß an dem NO_2-Wert des Nitrofibroins doch etwa noch andere Aminosäuren, z. B. das Histidin[1]), teilhaben könnten, wurde nach achtstündiger Hydrolyse mit HCl (20proz.) die mit Wasser etwa fünffach verdünnte Lösung mit Phosphorwolframsäure (10proz.) ausgefällt, die Phosphorwolframsäure im Filtrat durch festen Ätzbaryt beseitigt (Phosphorwolframsäure gibt mit $SnCl_2$ eine blaue Farbe, die ein Titrieren mit Jod und Stärke unmöglich macht), das zweite Filtrat, genau neutralisiert, eingeengt, von der Salzausscheidung befreit und schließlich mit einem aliquoten Teile die NO_2-Bestimmung ausgeführt. Die Berechnung ergab etwa **73 Proz.** des theoretischen Wertes, also Übereinstimmung mit der Hydrolyse ohne Phosphorwolframsäurefällung. Eine Fällung mit *Hopkins* Reagens (10proz. $HgSO_4$ in 5proz. H_2SO_4) war minimal, da ja Tryptophan fehlt.

3. Um einen weiteren Einblick in den Mechanismus des Vorganges zu gewinnen, war es notwendig, die Wirkung *verschiedener HNO_3-Konzentrationen* bei der Nitrierung von Fibroin zu studieren.

Zur ersten Orientierung setzte ich 20 g Fibroin mit 1 Liter HNO_3 konzentriert (etwa 60 proz.) an. Die Flüssigkeit färbte sich stark braun und das Produkt ging zum größten Teil in Lösung. Nach 24 Stunden

[1]) Histidin, Lysin und Arginin sind im Fibroin nur *in sehr geringen Mengen* vertreten, vgl. *E. Fischer* und *A. Skita*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, 221.

wurde in viel Wasser gegossen und die sehr spärliche, aber voluminöse Fällung auf gehärtetem Filter filtriert; das Nachwaschen dauerte mehrere Tage. Es verblieben nach dem Trocknen nur 0,8 g eines dunkelbraunen Pulvers. Dem Nitrowert 0,026 g NO_2 gegen 0,022 g berechnet, kommt natürlich keine Bedeutung zu.

Nunmehr wurde die Wirkung von HNO_3 (5-, 10-, 20-, 30- und 40proz.) auf Fibroin bzw. das daraus entstandene Nitrofibroin untersucht.

a) 10 g Fibroin, mit ½ Liter HNO_3 (5 proz.) 2 Tage stehen gelassen, liefern ein ungefärbtes Produkt, das *positiven* Millon, aber negative Xanthoproteinreaktion (mit NaOH) gab; die NO_2-Bestimmung zeigte dementsprechend einen Wert, der sich, wie der für Fibroin selbst, in den Fehlergrenzen hält (0,0054 g NO_2 für 2 g Substanz). Bei Anwendung von 5 proz. HNO_3 kann also von einer Nitrierung noch nicht gesprochen werden.

b) Werden 10 g Fibroin mit ½ Liter HNO_3 (10 proz.) 2 Tage angesetzt und wie gewöhnlich behandelt, so erhält man ein schwach gelblich gefärbtes Produkt, das noch starken Millon und sehr schwache Xanthoproteinreaktion zeigte; 2,005 g Substanz gaben 0,018 g NO_2.

c) Eine Wiederholung der obigen Versuche mit HNO_3 (20 proz.) ergab für 2,006 g **0,046 g,** für 2,007 g **0,050 g NO_2.**

Im Verlaufe der Versuche mit Casein (s. unten) stellte es sich heraus, daß bei der Nitrierung NO_3-Gruppen aus der Salpetersäure vom Eiweiß so fest *verankert* werden können, daß sie sich durch einfaches Auswaschen auf der Nutsche nicht entfernen lassen. Die betreffenden Nitrokörper müssen dann in 1 proz. Na_2CO_3 quellen, wodurch die NO_3-Gruppen beseitigt werden, die sonst natürlich einen bedeutend höheren Nitrowert vortäuschen. Um eine solche Täuschung beim Fibroin auszuschließen, wurde das NO_2-Produkt gleichfalls durch etwa 24 Stunden in 1 proz. Na_2CO_3 stehengelassen, nachdem es vorher wie sonst auf der Nutsche sorgfältig NO_3-frei gewaschen worden war. Die Na_2CO_3-Lösung zeigte nachher *nie* eine HNO_3-Reaktion, und die NO_2-Bestimmung mit dem rötlich gefärbten Quellungsprodukt gab dementsprechend z. B. für 2,00 g Substanz 0,048 g NO_2. Beim Nitrofibroin findet also *keinerlei Verankerung* von NO_3-Gruppen statt.

d) 8 g Fibroin mit ½ Liter HNO_3 (30 proz.) versetzt und analog weiter behandelt, ergab für 2,005 g Nitroprodukt 0,054 g NO_2, nach dem Quellen in 1 proz. Na_2CO_3 wie in c) resultierte für 2,006 g 0,053 g NO_2.

e) Schließlich wurde schon fertiges NO_2-Fibroin mit HNO_3 (40 proz.) angesetzt und sorgfältig isoliert; 2,004 g Substanz, die sich im Aussehen nicht von dem Ausgangsmaterial unterschied, gab 0,054 g NO_2, nach dem Quellen in 1 proz. Na_2CO_3: 0,050 g.

Wir sehen also, daß die Nitrierung bei HNO_3 (5proz.) kaum merklich ist, sich bei HNO_3 (10proz.) nur partiell (etwa zu einem Drittel) vollzieht, bei HNO_3 (20proz.) aber schon einen Wert erreicht, der auch bei Anwendung stärkerer Konzentrationen nur mehr unbedeutend

zunimmt. Bei Anwendung von konzentrierter HNO_3 findet fast völlige Lösung des Fibroins statt.

Der Nitrowert, den das Nitrofibroin im Bereiche der 20- bis 40proz. HNO_3 zeigt, beträgt für 2 g Substanz: 0,046, 0,050, 0,048, 0,054, 0,053, 0,054, 0,050 g NO_2; die *Berechnung* für 2 g Substanz unter der Voraussetzung der ausschließlichen Mononitrierung des gesamten Tyrosins im Fibroin ergibt für 11 proz. Tyrosin: 0,053 g, für 10,5 proz. Tyrosin 0,0516 g NO_2; die Übereinstimmung muß als befriedigend bezeichnet werden.

V. Reduktion des Nitrofibroins.

Unter den zahlreichen bekannten Reduktionsmitteln erwies sich für den vorliegenden Zweck das Natriumhyposulfit[1]) $Na_2S_2O_4$ als das brauchbarste, da es das sauberste Arbeiten gestattet und von dem Reduktionsprodukt sehr bequem durch Auswaschen mit Wasser getrennt werden kann. Die Entfärbung geht im offenen Gefäße (bei freiem Luftzutritt) sehr langsam vor sich, beschleunigt wird die Reduktion durch Ausschluß des Luftsauerstoffs, und zwar gelingt dies am einfachsten, wenn man im H_2-Strome reduziert und eventuell dabei noch in der Schüttelmaschine schüttelt; doch ist der letztere Umstand nicht wesentlich; es genügt vollkommen, von Zeit zu Zeit mit der Hand kräftig zu schütteln und dabei den durch einen Quetschhahn gebremsten Wasserstoff aus dem Gefäße entweichen zu lassen, worauf man den Quetschhahn wieder zuklemmt. Es erwies sich ferner, speziell beim Arbeiten mit Nitrocasein, als ein wichtiger Faktor, das Nitroprodukt *vor* der Reduktion *nicht zu trocknen*; durch diesen Umstand wird die Reduktion bedeutend beschleunigt (etwa 2 Stunden). Das Produkt wird auf der Nutsche abgesaugt, gründlich ausgewaschen und getrocknet, es ist nunmehr farblos, äußerlich dem ursprünglichen Fibroin vollkommen ähnlich. Es löst sich nicht in verdünnter HCl, auch nicht in 10proz. NaOH (womit es sich schwach gelblich färbt), *Millons* Reagens ruft gelbbraune Farbe hervor, ist also *negativ*. Die NO_2-Bestimmung ergab gleichfalls ein negatives Resultat.

Es wäre nun das nächste Ziel gewesen, in diesem Reduktionsprodukt die NH_2-Gruppen nach den Methoden von *van Slyke* oder *Sörensen* zu bestimmen und das Resultat mit den aus Nitrofibroin gewonnenen Zahlen zu vergleichen; doch standen der Verwirklichung dieser Absicht die Eigenschaft des Fibroins und seiner Derivate entgegen, sich nur in starker Säure oder starkem Alkali zu lösen, wobei natürlich die Eiweißmolekel weitgehend in ihre Aminosäuren zerlegt

[1]) Bezeichnung nach *K. A. Hofmann*, Lehrb. d. anorg. Chem., 4. Aufl., 1922, S. 166.

wird. Dabei treten so zahlreiche NH_2-Gruppen auf, daß nicht erwartet werden konnte, die sehr geringe Differenz zwischen dem NH_2-Gehalt des Fibroins und dem des eben besprochenen Reduktionsproduktes wahrzunehmen. Es kann sich z. B. bei den im *van Slyke*-Apparate zu behandelnden Mengen um höchstens 4 bis 5 mg Amino-N handeln. Dieser Frage konnte mithin erst beim Casein nähergetreten werden.

10 g Reduktionsprodukt wurden mit 150 ccm 30proz. $NaNO_2$ und 38 ccm Eisessig versetzt, es trat starke NO_2-Entwicklung ein; die dunkel orange gefärbten Fäden wurden abgesaugt und gründlich ausgewaschen; das Produkt gab mit $FeCl_3$ keine Reaktion, mit NaOH wird es dunkelviolett. Der als „Nitrowert" berechnete Reduktionswert für 2 g nach Behandlung mit 1 proz. Na_2CO_3 betrug 0,023 bis 0,019 g. Auch das Hydrolysat mit 25 proz. H_2SO_4 gibt keinerlei deutliche Reaktion auf Brenzcatechinderivate.

VI. Bestimmung der NO_2-Gruppen im nitrierten Casein.

Ganz wie beim Fibroin wurden 20 g Casein (*Hammarsten*) mit ½ Liter 20proz. HNO_3 über Nacht stehengelassen, dann auf gehärtetem Filter abgesaugt und das gelbe Pulver mit Wasser frei von NO_3 gewaschen. Die Ausbeute betrug etwa 20 g. Das Nitroprodukt ist im Wasser, Alkohol und verdünnter HCl unlöslich, löst sich allmählich, schneller beim Erwärmen in konzentrierter HCl, sowie in NaOH, dabei tritt Rotfärbung ein (Xanthoproteinreaktion); die *Millon*sche Reaktion ist *negativ*; ebenso die Voisenetreaktion auf Tryptophan[1]).

Die wie in IV. ausgeführte NO_2-Bestimmung ergab nun ein überraschend hohes Resultat:

2,276 g	Nitrocasein	lieferten	0,045 g	NO_2
2,007 g	„	„	0,044 g	„
2,013 g	„	„	0,041 g	„ ;

wurde mit 20 proz. HCl durch 12 Stunden hydrolysiert, so ergaben 2,015 g Nitrocasein 0,035 g NO_2, also eine Erniedrigung wie beim Nitrofibroin.

Demgegenüber gab die Berechnung einen entschieden niedrigeren, wenn auch durchaus nicht sichergestellten Wert; es war ja zunächst die Hauptfrage, *ob bei der Nitrierung das Tryptophan beteiligt ist*, noch keineswegs entschieden; ferner ist aber auch der *Tyrosingehalt des Caseins* nicht übereinstimmend festgesetzt. *Fürth* und *Fleischmann* (l. c.) finden 5 bis 5,5 Proz., *Folin* und *Looney*[2]) 6 bis 6,5 Proz.; der Tryptophangehalt des Caseins dürfte mit 1,6 Proz. richtig angenommen sein, da sich die Werte von *Fürth*, *Nobel* und *Lieben*[1]) im Verlaufe von in diesem Institut angestellten Untersuchungen von *Fürth* und *Z. Dische*

---

[1]) Vgl. *O. Fürth* und *E. Nobel*, diese Zeitschr. **109**, 103; *O. Fürth* und *F. Lieben*, ebendaselbst **109**, 124.

[2]) *O. Folin* und *J. M. Looney*, Journ. biol. Chem. **51**, 421.

(erscheint demnächst) als zu hoch herausgestellt haben. 2 g Nitrocasein müßten liefern für

5 proz.	Tyrosin	0,025 g NO_2
5,5 ,,	,,	0,028 g ,,
6 ,,	,,	0,030 g ,,
6,5 ..	,,	0,033 g ,,

Hierzu käme eventuell der NO_2-Wert für 1,6 proz. Tryptophan: 0,0070 g NO_2; der NO_2-Wert konnte mithin in Summa 0,032, 0,035, 0,037 und 0,040 g betragen, also zwischen 0,032 und 0,040 g liegen; die oben gefundenen Werte von 0,041 bis 0,045 g erscheinen also jedenfalls auffallend hoch, zumal man in Analogie zum Fibroin erwarten sollte, daß bei Verwendung von 20proz. HNO_3 der gefundene Nitrowert sich eher etwas unter dem theoretischen Wert halten würde. Es galt nun, dieses abweichende Verhalten des Caseins zu erklären.

Die Untersuchung mußte sich zu diesem Zwecke in zwei Richtungen bewegen: 1. mußte die Frage der Beteiligung von Tryptophan an der Nitrierung geklärt und 2. mußte die Ursache der dann noch verbleibenden Differenz ermittelt werden.

1. Frage der Beteiligung von Tryptophan an der Nitrierung.

Zur ersten Orientierung wurde eine Reihe von Eprouvettenversuchen mit je 0,05 g Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin und Prolin und je 10 ccm 20proz. HNO_3 in der Kälte angesetzt. Es färbte sich Tyrosin braunrot, Tryptophan schwach gelblich, die anderen Aminosäuren blieben *farblos*. Es sei hier ausdrücklich bemerkt, daß Phenylalanin sich bei den hier in Betracht kommenden Bedingungen (in der Kälte) *nicht* mit HNO_3 färbt, erst beim Erhitzen mit konzentrierter HNO_3 tritt Gelbfärbung ein. Zum Zustandekommen der „Xanthoproteinreaktion" ist also das Vorhandensein eines Phenolkernes notwendig, der Benzolkern liefert keine Färbung[1]), auch der Indolkern des Tryptophans dürfte vorher einer Oxydation unterliegen. Ebensowenig wie dieser Orientierungsversuch konnte die Hydrolyse des Nitrocaseins mit 20- bis 40proz. HCl oder die Ausfällung des Tryptophankomplexes mit *Hopkins* Reagens (s. oben) die Frage der Beteiligung des Tryptophans an der Nitrierung zur Entscheidung bringen. Sowohl nach achtstündiger Hydrolyse mit 20proz. HCl und direkter NO_2-Bestimmung, als nach der auf die Hydrolyse folgenden Ausfällung mit 10proz. Phosphorwolframsäure einerseits, mit *Hopkins*

[1]) Wenn es sich bei der Xanthoproteinreaktion des Urochromogens von *Weiss* (diese Zeitschr. **134**, 567 bzw. 587) wirklich um Phenylalanin handelt, so könnte sich in diesem Falle der Phenolkern allenfalls durch die oxydierende Wirkung der konzentrierten HNO_3 in der Hitze bilden; vgl. auch *H. Brunswick* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **127**, 268).

Reagens andererseits, blieb der NO_2-Wert, auf 2 g umgerechnet: 0,040 g NO_2 bzw. 0,037 und 0,036 g NO_2; die geringe Abnahme konnte natürlich ebensogut auf die beim Fibroin besprochene Bildung von „säurelöslichem Humin“ (nach *Gortner*) aus *NO_2-Tyrosin,* wie auf die Zerstörung bzw. Ausfällung von *nitriertem Tryptophan* zurückgeführt werden. Zu der letzteren Alternative ist aber zu bemerken, daß sich ein nitriertes Tryptophan gegen HCl und *Hopkins* Reagens gar nicht wie ursprüngliches Tryptophan zu verhalten braucht. Es könnte 1. der nitrierte Komplex bei HCl-Behandlung erhalten bleiben, 2. könnte auch bei Zerstörung desselben ein Teil, mit der NO_2-Gruppe beladen, durch $SnCl_2$ reduziert werden; ja schließlich könnte diese Zerstörung des Tryptophankomplexes schon gleich *bei der Nitrierung* erfolgt sein, trotzdem aber der Teil mit der Nitrogruppe den Nitrowert des Nitrocaseins mitbestimmen. Mit Rücksicht auf die bekannte Labilität des Tryptophans erscheint mir die letzte Eventualität als die wahrscheinlichste. So blieb nichts übrig, als Tryptophan derart zu nitrieren, daß mit dem Produkt eine NO_2-Bestimmung ausführbar wäre, und zwar bestand die Schwierigkeit darin, den Tryptophankomplex aus dem Nitrierungsgemisch in unlöslicher Form abzuscheiden.

Hierzu wurde die Mutterlauge einer an Tryptophan reichen Kristallisation, die durch zweimalige Fällung mit *Hopkins* Reagens und Waschen mit 5proz. H_2SO_4 sorgfältig von Tyrosin befreit worden war, verwendet. Die dunkelgefärbte Mutterlauge wurde mit konzentrierter HNO_3 auf 20proz. HNO_3 gebracht und über Nacht stehengelassen; dann wurde mit NaOH deutlich alkalisch gemacht und mit Merkuriacetat das überschüssige Alkali gefällt; hierbei erscheint das Filtrat der vorher stark rotbraun gefärbten Lösung nur mehr schwach gelblich, es wird also ein guter Teil des in alkalischer Lösung stark gefärbten nitrierten Tryptophankomplexes vom Niederschlag mitgerissen. Dieser Niederschlag wird NO_3-frei gewaschen, in schwach salzsaurem Wasser suspendiert, das Hg als HgS ausgefällt, das Filtrat durch Luftdurchleiten von H_2S befreit, genau neutralisiert, eingeengt und schließlich nach Zufügen von starker HCl die NO_2-Bestimmung ausgeführt. Das Resultat hatte natürlich nur qualitative Bedeutung, war aber *deutlich positiv.* Ein blinder Versuch ohne Tryptophanzusatz erwies sich als negativ. (Im Gegensatz hierzu bleibt bei Verwendung von Bleiacetat als Fällungsmittel auch *nach dem Auswaschen* NO_3 im Niederschlag nachzuweisen, offenbar durch Bildung von unlöslichem basischen Bleinitrat.)

Doch hatte mir schon vorher die Verfolgung der zweiten Frage (nach dem Ursprung des hohen Nitrowertes beim Nitrocasein) die Überzeugung verschafft, *daß Tryptophan an der Bildung des Nitrowertes beteiligt ist.*

2. *Erklärung des Nitrowertes beim Nitrocasein.*

Es war naheliegend, daran zu denken, daß die Salpetersäure neben ihrer nitrierenden auch eine *oxydierende* Wirkung auf die Eiweißkörper ausüben könnte, und daß die so entstandenen Oxydationsprodukte

durch $SnCl_2$ wieder reduziert werden könnten. Es wurde also zunächst die Wirkung von Oxydationsmitteln, die *nicht* nitrieren, auf Fibroin und Casein untersucht: diese Einwirkung mußte aber, der von 20proz. HNO_3 entsprechend, eine *milde* sein.

So wurden z. B. 10 g Casein in schwach alkalischer Lösung mit 5 g $KMnO_4$ in Wasser versetzt, von MnO_2 filtriert, der Niederschlag nochmals mit Wasser ausgekocht, die vereinigten Filtrate mit Essigsäure neutralisiert und mit etwa dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Die spärliche Fällung wurde abgesaugt und getrocknet; Xanthoproteinreaktion und Voisenet negativ; Millon spurenweise. 1,70 g Substanz liefern Nitrowert 0, genau so wie das *ursprüngliche Casein*. *Fürth* [1]) hat aus Casein durch Oxydation mit $KMnO_4$ sogenannte *Peroxyprotsäuren* in Form der Bleisalze dargestellt. Diese mir von ihm freundlichst zur Verfügung gestellten Stoffe gaben nach Entfernung des Bleies mit HCl *positive* Werte bei der Nitrobestimmung. Deutlich positive Werte liefern auch *Chinone* (1 g Benzochinon gibt z. B. im Mittel 0,1 g „Nitrowert". Dieser Wert, auf 2 g Nitrocasein entsprechend umgerechnet, gibt 0,007 g NO_2). Quantitative Schlüsse ließen sich aus diesen Beobachtungen *nicht* ziehen.

Einen Fortschritt brachte erst der Versuch, analog wie beim Fibroin, die *Konzentration der Salpetersäure zu variieren.*

Als nämlich 10 g Casein mit ½ Liter 5proz. HNO_3 in gewohnter Weise angesetzt wurden, blieb das Reaktionsprodukt rein weiß und zeigte unveränderte Millon- sowie positive Tryptophanreaktion, jedoch keine Färbung mit NaOH. Eine Nitrierung konnte mithin *nicht* stattgefunden haben. Nichtsdestoweniger lieferten die NO_2-Bestimmungen für je 2 g Substanz: 0,018, 0,016, 0,013 g NO_2, also deutlich positive, außerhalb der Fehlergrenzen liegende Werte.

Versuche mit 10proz. HNO_3 lieferten dagegen bereits gelbe Körper mit *negativem Millon* und *Voisenet*, positiver Xanthoproteinreaktion und Nitrowerten in der Nähe der früher erwähnten: 0,038, 0,040, 0,043, 0,044 g NO_2.

Es ergibt sich, daß auch *ohne* erfolgte Nitrierung das mit HNO_3 behandelte Casein bei der Bestimmung positive Werte geben kann; diese sind offenbar auf verankerte NO_3-Gruppen zurückzuführen, die sich durch einfaches Auswaschen mit Wasser nicht beseitigen lassen (Gegensatz zum Fibroin; s. oben).

Für diese Annahme sprachen auch die Schwankungen in den Nitrowerten, die namentlich bei Anwendung stärkerer Säure hervortreten, besonders aber das weitere starke Ansteigen der Nitrowerte bei Nitrierung von mittels 20proz. HNO_3 dargestelltem Nitrocasein durch 30proz. bzw. 40proz. HNO_3; es wurden 0,063, 0,055 bzw. 0,060 g NO_2 gefunden.

Der nächste Schritt war, die verankerten NO_3-Gruppen aus dem Nitrocasein zu entfernen; dies geschah (wie schon oben beim Fibroin

---

[1]) *O. v. Fürth*, Hofmeisters Beitr. **6**, 318, 1905.

erwähnt) durch 1proz. Sodalösung. Dabei geht das Nitrocasein in eine rötliche, zähe Lösung mit positiver HNO_3-Reaktion über; nach Stehen über Nacht wurde mit verdünnter HCl ein zäher, gelber Niederschlag gefällt, auf Faltenfilter filtriert und sorgfältig NO_3-frei gewaschen. Der getrocknete Körper wird zu einem Pulver zerrieben. Das Resultat einiger derartiger Versuche, immer mit 2 g Substanz, war 0,031, 0,031, 0,037, 0,038 g NO_2; Casein, mit 30proz. HNO_3 behandelt, gab nach dem Quellen in 1proz. Na_2CO_3-Lösung usw. 0,037, *Nitrocasein*, mit 40proz. HNO_3 angesetzt, lieferte 0,035 g NO_2, nach nochmaligem Quellen 0,033 g NO_2. Eine Wiederholung des Quellens setzt, wie mehrfach konstatiert wurde, den Nitrowert des Caseins *nicht* wesentlich herab. Ein Kontrollversuch wurde mit Casein, das mit 5proz. HNO_3 behandelt worden war, angestellt; derselbe lieferte einen Nitrowert innerhalb der Fehlergrenze. Wird ein aus 10proz. HNO_3 dargestelltes Nitrocasein der Quellung wie oben unterworfen, so ergibt sich 0,017, 0,020 g NO_2.

Es zeigt sich, daß das Casein nach dem Entfernen der verankerten NO_3-Gruppen sich bei der Nitrierung dem Fibroin analog verhält: Die 5proz. HNO_3 ist wirkungslos, die 10proz. HNO_3 bewirkt bereits eine partielle Nitrierung, 20-, 30- und 40proz. HNO_3 ergeben Werte von **0,031** bis **0,038 g**, doch ohne stetig ansteigenden „Gang". Stellen wir nun die theoretische Berechnung gegenüber (s. oben), so finden wir für einen Tyrosingehalt von 6,5 Proz.[1]) den Wert **0,033 g NO_2**; oder bei Hinzuzählung von 0,0070 g NO_2 für 1,6 proz. Tryptophan **0,040 g** NO_2. Ohne vollkommene Gewißheit zu geben, steht, zumal unter Berücksichtigung der Beobachtungen von Fibroin, die zweite Annahme entschieden mit den gefundenen Daten in besserem Einklang.

VII. Reduktion des Nitrocaseins.

Nitrocasein wird in 1proz. Na_2CO_3-Lösung gelöst, dann mit $Na_2S_2O_4$ versetzt (z. B. 50 g $Na_2S_2O_4$ auf 10 g Substanz in 150 ccm 1proz. Na_2CO_3) und im H_2-Strome in 1 bis 2 Stunden (s. oben beim Nitrofibroin, V) reduziert, wobei die Lösung farblos wird. Das Produkt wird durch verdünnte HCl gefällt (starke SO_2-Entwicklung und vorübergehende Orangefärbung durch Freiwerden der Unterschwefelsäure), abgesaugt, vom abgeschiedenen Schwefel durch Digerieren mit Schwefelkohlenstoff befreit und ausgewaschen. Das Auswaschen muß möglichst rasch vor sich gehen; denn die Substanz hat in reinem Wasser die Tendenz, zu quellen bzw. sich zu lösen; auch in Alkali ist sie etwas

[1]) Nach neuen übereinstimmenden Bestimmungen, die im hiesigen Institute nach zwei verschiedenen Methoden (Bromaddition und modifiziertes Millonverfahren) gefunden worden sind.

löslich, unlöslich in verdünnten Säuren. Millon- und Voisenetreaktion sind negativ, der Nitrowert liegt in den Fehlergrenzen.

Im Gegensatz zu dem Reduktionsprodukt beim Fibroin war hier im Prinzip die Möglichkeit gegeben, die freien Aminogruppen nach dem Verfahren von *van Slyke* oder *Sörensen* zu bestimmen, da eine Auflösung der Substanz (zumal im feuchten Zustande) in verdünntem Alkali ohne erhebliche Desintegration ausführbar erschien. Man konnte so zu einem Vergleich zwischen ursprünglichem Casein und dem Reduktionsprodukt gelangen; allerdings war es beim letzteren auch angezeigt, die Zeit der Reduktion in der Natriumhyposulfitlösung möglichst abzukürzen; auch hier konnte ja Desintegration eintreten.

VIII. Aminogruppenbestimmung nach van Slyke bei Casein, Nitrocasein und dessen Reduktionsprodukt.

Ich entschied mich für das Verfahren nach *van Slyke* und benutzte den von ihm in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abt. I, Teil 7, S. 263 ff., 1922, dort auch Literatur) beschriebenen Apparat; eine Schüttelvorrichtung stand mir nicht zu Gebote.

Mit der Bestimmung der freien Aminogruppen in einigen Proteinen haben sich *van Slyke* und *Birchard*[1]), ferner *Herzig* und *Lieb*[2]) beschäftigt; auch Casein wurde untersucht, die ersteren bedienten sich dabei einer Mikroapparatur. Selbstverständlich mußten bei der mir zur Verfügung stehenden großen Apparatur auch *größere Eiweißmengen* zu den Bestimmungen verwendet werden, als sie von den oben genannten Autoren benutzt worden waren; also Mengen, die bei der Bestimmung wenigstens einige Kubikzentimeter Aminostickstoff entwickeln mußten; anderenfalls war irgend eine wahrnehmbare Abweichung zwischen dem Aminostickstoff des Caseins und dem des Reduktionsproduktes nicht zu erwarten. Dabei wird der durch verdünntes Alkali in Lösung gebrachte Eiweißkörper beim Vermischen mit der salpetrigen Säure und dem Eisessig natürlich gefällt und der Niederschlag — bei Verwendung von 0,1 bis 0,2 g Substanz eine beträchtliche Menge — hat die Tendenz, überzuschäumen und die Kapillaren des Apparates zu verstopfen; durch Zusatz von einigen Tropfen Oktylalkohol (nach *van Slyke*) kann man zumeist das letztere, nicht aber das erstere verhindern; andererseits darf in Ermangelung der Schüttelvorrichtung keinesfalls vor Ablauf einer halben Stunde die erste Ablesung vorgenommen werden; weitere Ablesungen im Verlaufe von etwa weiteren halben Stunden bringen regelmäßig Zunahmen von 0,5 bis 1 ccm; zu einem Endpunkte

[1]) *D. D. van Slyke* und *F. J. Birchard*, Journ. of biol. Chem. **16**, 539, 1913.
[2]) *J. Herzig* und *H. Lieb*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **117**, 1921.

kommt man überhaupt nicht, da der Eiweißkörper im Apparat unter der Einwirkung der salpetrigen Säure allmählich desintegriert wird, was natürlich ein Ansteigen des Aminostickstoffwertes zur Folge hat. Es ist klar, daß bei den erwähnten Schwierigkeiten ich den gefundenen *absoluten* Werten keine große Bedeutung zumessen kann, wohl aber ist es bei Einhaltung gleicher, namentlich zeitlicher Bedingungen möglich, die beim Casein gefundene Wertreihe mit der von Nitrocasein oder dem Reduktionsprodukt herstammenden Reihe zu vergleichen und daraus Schlüsse auf den Verlauf der *Desintegration bei der Nitrierung* oder auf das eventuelle Auftreten *neuer Aminogruppen* zu ziehen.

Nach Ausführung einer blinden Bestimmung wurde der Apparat mit Alanin, Leucin, Tyrosin und Nitrotyrosin erprobt; die Resultate waren befriedigend, wenn es mir auch nicht gelang, jenen Grad von Genauigkeit zu erreichen, den *van Slyke*[1]) angibt.

I. Ein Orientierungsversuch mit 5 g Casein, in 50 ccm 2proz. NaOH gelöst, ergab für 5 ccm (0,5 g Casein) Lösung bei $^3/_4$ Stunden Versuchsdauer 2,7 mg Amino-N; die folgenden Resultate wurden nunmehr auch auf 0,5 g Substanz umgerechnet. Weitere Versuche, berechnet für 0,5 g Casein, ergaben 2,6 und 2,3 mg Amino-N.

Es wurden nun bei einer Bestimmung mehrere Ablesungen vorgenommen; dabei wurde gefunden für 0,5 g Substanz:

a) Nach	$^1/_2$ Stunde	1. Ablesung	2,1 mg Amino-N,	b) 2,6 mg Amino-N
,,	$^3/_4$,,	2. ,,	2,6 ,, ,,	3,4 ,, ,,
,,	1 ,,	3. ,,	3,2 ,, ,,	4,0 ,, ,,
,,	$1^1/_4$,,	4. ,,	3,5 ,, ,,	4,5 ,, ,,
,,	$1^1/_2$,,	5. ,,	3,5 ,, ,,	4,7 ,, ,,

eine dritte Reihe gab die Zahlen c) 1,9, 2,6, 3,5, 4,2, 4,4 mg Amino-N.

Ein Mittelwert kann mit 3,2 mg Amino-N für 0,5 g Casein, i. e. 0,64 Proz. angenommen werden, in Prozenten des Gesamt-N (= 15 Proz.) beträgt der Wert 4,3 Proz. *Van Slyke* gibt den letzten Wert mit 5,5 Proz. an. Da er, wohl mit Recht, den freien Aminostickstoff der Proteine auf die ω-Aminogruppe des Lysins zurückführt, stützt er den letztangeführten Wert auf eine Bestimmung des Lysins in einigen Proteinen[2]). Danach enthielte das Casein etwa 8 Proz. Lysin. Die weitere Forschung wird ergeben, ob es bei dieser Zahl bleibt.

II. Es wurde nunmehr zunächst das *Nitroprodukt* (aus 20proz. HNO_3) untersucht. Dieser Körper löst sich ebenso wie sein Reduktionsprodukt, in völlig trockenem Zustande *nicht* in 2proz. NaOH; man muß *feuchte* Substanzen verwenden, von denen man einen aliquoten Teil zur Trockensubstanzbestimmung benutzt.

---

[1]) *D. D. van Slyke*, Journ. of biol. Chem. **9**, 185 (s. Tabelle S. 193f.).
[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **16**, 531.

1. 4,62 g in 50 ccm 2proz. NaOH gelöst; *van Slyke* mit 5 ccm (0,462 g)

1. Ablesung	nach	40	Minuten	3,6	mg	Amino-N
2. „	„	55	„	4,0	„	„
3. „	„	70	„	4,4	„	„
4. „	„	85	„	4,4	„	„

i. e. für 0,5 g Substanz 4,0 bis 5,0 mg Amino-N.

2. 2,60 g in 50 ccm 2proz. NaOH gelöst, liefern für 0,26 g 2,4, 2,9, 3,0 mg Amino-N, i. e. für 0,5 g 4,6 bis 5,8 mg Amino-N, am folgenden Tage war der Amino-N-Wert noch derselbe; die Desintegration geht also in 2proz. NaOH in der Kälte kaum merklich vor sich. Nach einstündigem Erhitzen der Lösung auf dem Wasserbade stieg der Wert für 0,5 g auf im Mittel 6,7 mg, nach vierstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade und Stehen über Nacht auf 14 mg; bei weiterer Fortsetzung des Versuches begannen sich Teilchen abzuscheiden. Man sieht, wie langsam die Desintegration unter diesen Bedingungen fortschreitet.

III. 1. Von dem Reduktionsprodukt des Nitrokörpers wurden 12 g in 100 ccm 2proz. NaOH gelöst. *Van Slyke* mit 5 ccm (= 0,6 g) ergab im Verlaufe mehrerer Ablesungen 3,5 bis 5,2 mg bzw. für 0,5 g Substanz 2,9 bis 4,20 mg Amino-N.

2. 3,15 g Reduktionsprodukt analog behandelt; *van Slyke* mit 5 ccm (0,31 g) ergab 2,0 bis 3,8 mg, i. e. für 0,5 g 3,3 bis 6,4 mg.

Wenn wir also die für je 0,5 g Casein, Nitrocasein und dessen Reduktionsprodukt gefundenen Mittelwerte zusammenstellen, und zwar für Casein 3,2, Nitrocasein 4,8, Reduktionsprodukt 4,2 mg Aminostickstoff, so sieht man, daß die Werte für den Nitrokörper und dessen Reduktionsprodukt den Aminostickstoffwert für Casein deutlich übertreffen, entsprechend der durch die Vorbehandlung (HNO_3 und 1proz. Na_2CO_3- bzw. $Na_2S_2O_4$-Lösung) hervorgerufenen geringfügigen Desintegration, daß die beiden ersterwähnten Stoffe aber untereinander *keinen außerhalb des Versuchsfehlers liegenden Unterschied* aufweisen. Es sind also bei der Reduktion des Nitrokörpers freie Aminogruppen *nicht* gebildet worden, die sich mit der Methode von *van Slyke* nachweisen lassen. Ob die Ursache dieser Erscheinung in chemischen Umlagerungen in der Eiweißmolekel oder in anderen unbekannten Faktoren zu suchen ist, kann ich derzeit nicht entscheiden.

Selbstverständlich verlor durch diesen Befund der Plan, das Reduktionsprodukt zu diazotieren, stark an Interesse. Es wurden 8 g Reduktionsprodukt mit 120 ccm 30proz. $NaNO_2$ und 31 ccm Eisessig allmählich versetzt, das Reaktionsprodukt abgesaugt und ausgewaschen. Dasselbe war braun gefärbt, löste sich in 10proz. NaOH allmählich mit dunkelroter, in konzentrierter HCl rasch mit hellbrauner Farbe, Millon ist negativ, $FeCl_3$ gibt keine deutliche Reaktion. Eine NO_2-Bestimmung mit 2 g gab einen „Nitrowert" von 0,018 g; die Unlöslichkeit der Produkte in 2- bis 4proz. NaOH verhinderte die Ausführung einer Bestimmung nach *van Slyke*. Auch nach vollständiger Hydrolyse in 25proz. H_2SO_4 und Ausfällung der H_2SO_4 durch Ätzbaryt zeigte das braune Filtrat keine Reaktion mit $FeCl_3$, die auf das Vorhandensein eines Brenzcatechinderivates hindeuten würde.

IX. Verlauf der Desintegration bei der Nitrierung.

Wenn nun, wie oben gezeigt, bei der Reduktion des Nitrocaseins ein „Aminocasein" mit neu auftretenden Aminogruppen sich *nicht* gebildet hatte, so zeigte andererseits das Ansteigen des Amino-N-Wertes bei dieser Substanz sowie beim Nitrocasein gegenüber dem Casein das Eintreten einer, wenn auch geringfügigen *Desintegration bei der Nitrierung* an; deren Verlauf bei Verwendung verschiedener Säurekonzentrationen bis zur höchsten zu studieren, versprach einen weiteren Einblick in den in dieser Arbeit behandelten Vorgang.

A. Zunächst wurde der Amino-N-Wert bei *totaler Hydrolyse* für Casein, Nitrocasein und dessen Reduktionsprodukt ermittelt; die für die Bestimmung verwendeten Proben wurden mit 30proz. NaOH neutralisiert.

1. 10 g Casein wurden in 100 g 25proz. H_2SO_4 am Babotrichter und Rückflußkühler durch 10 Stunden erhitzt.

Van Slyke mit 1 ccm des Filtrates (= 0,09 g Casein) ergab 10,8 mg Amino-N, i. e. für 0,5 g 60 mg Amino-N.

In einem analog behandelten Hydrolysat ergab die Bestimmung für 0,106 g Substanz 11,8 bis 12,1 mg; i. e. für 0,5 g 55,5 bis 57,1 mg Amino-N

2. 5,4 g Nitrocasein, analog behandelt, gab bei zwei Bestimmungen für 0,077 g Substanz 8,3 bzw. 8,5 mg; i. e. für 0,5 g 53,9 bis 55,2 mg Amino-N.

3. 7,0 g Reduktionsprodukt, wie 1. behandelt, gab bei einer Bestimmung für 0,063 g Substanz 6,8 bis 7,3 mg; i. e. für 0,5 g 53,9 bis 57,1 mg Amino-N.

Es dürfte also nach diesen Bestimmungen für die untersuchten Substanzen in guter Übereinstimmung 55 mg Amino-N als Mittelwert für 0,5 g anzunehmen sein.

Es wurde noch eine 42stündige Hydrolyse von 5 g Casein angesetzt; ihr Ergebnis war, für 0,5 g Substanz berechnet, **61,8** bis **62,7 mg** Amino-N. Bleiben wir bei diesem höchsten Werte von 62 mg und ziehen hiervon die Zahl für den Ammoniakstickstoff ab, der im Werte nach *van Slyke*[1]) mit enthalten ist, so gäbe dies in Prozenten des Gesamt-N (= 15 Proz.) 82,7 — 10,0 = 72,7 Proz. [*van Slyke*, l. c., findet 68,28 Proz., *Osborne* und *Guest*[2]) 71,7 Proz.], und für 0,5 g Substanz berechnet **54 mg Amino-N.**

B. Es wurde ferner der Amino-N-Wert für Nitrocasein aus 30-, 40- und 60proz. (konzentrierter) HNO_3 bestimmt.

1. 2,43 g Nitrocasein aus 30proz. HNO_3 wurden in 100 ccm 1proz. NaOH gelöst. Zwei Proben à 5 ccm (= 0,121 g) ergaben nach *van Slyke* 1,72 bzw. 1,90 mg Amino-N, i. e. für 0,5 g 7,2 bis 7,8 mg Amino-N.

2. 2,1 g Nitrocasein aus 40proz. HNO_3 in 50 ccm 2proz. NaOH gelöst, gaben für Proben à 2 ccm (= 0,084 g) 1,2 bis 1,5 mg Amino-N, i. e. für 0,5 g 8,0 mg Amino-N.

---

[1]) Vgl. *D. D. van Slyke*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 3179, 1910.

[2]) *Th. B. Osborne* und *H. H. Guest*, Journ. of biol. Chem. **9**, 335, 1910.

3. 20 g Casein wurden mit 200 ccm konzentrierter HNO_3 angesetzt, es trat über Nacht vollständige Lösung ein (Volumen 220 ccm). Da beim Neutralisieren von Proben der Lösung voluminöse Fällungen auftreten, die ein Einführen in den van-Slyke-Apparat unmöglich machen, wurden die Bestimmungen mit Proben à 1 ccm der ursprünglichen Lösung gemacht. Die konzentrierte HNO_3 verursacht zunächst stürmische Gasentwicklung, die aber bald nachläßt; eine Fällung tritt im Apparat natürlich nicht auf. 1 ccm (= 0,091 g) ergab 2,15 mg; i. e. für 0,5 g 11,8 mg Amino-N. Eine Probe nach zweitägigem Stehen dieser Lösung gab denselben Wert; auch die konzentrierte Säure bewirkt also beim Stehen in der Kälte nur *sehr langsame Desintegration*. Ein weiterer Versuch mit 1 ccm Lösung (= 0,05 g) gab 1,28 mg, für 0,5 g 12,8 mg Amino-N; Mittelwert für 0,5 g Substanz **12,3 mg Amino-N.**

Stellen wir nun die Werte nach *van Slyke* für 0,5 g Substanz zusammen, denen ich, wie schon erwähnt, nur als *Vergleichswerte* Bedeutung beimessen kann, so finden wir:

a)	Casein (*Hammarsten*)	3,2 mg Amino-N
b)	Nitrocasein aus 20proz. HNO_3 . . .	4,8 ,, ,,
c)	,, ,, 30 ,, ,, . . .	7,5 ,, ,,
d)	,, ,, 40 ,, ,, . . .	8,0 ,, ,,
e)	,, ,, 60 ,, ,, . . .	12,3 ,, ,,

bei totaler Hydrolyse steigt der entsprechende Wert nach Abrechnung des NH_3 auf 54 mg.

Berechnen wir nun für die Nitrocaseine den ,,Desintegrationsfaktor'', verglichen mit der vollständigen (100proz.) Desintegration bei totaler Hydrolyse, entsprechend 54 mg Amino-N, unter der wohl berechtigten Annahme, daß der Wert 3,2 mg für Casein der noch *intakten* Eiweißmolekel entspricht (Desintegrationsfaktor 0), so ergibt sich für

a)	54 : 3,2 = 16,9	i. e. 100 Proz. Hydrolyse	(16,9 : 1,5 = 100 : x) x = 8,8 usw.
b)	4,8 : 3,2 = 1,5	i. e. 8,8 ,, ,,	
c)	7,5 : 3,2 = 2,3	i. e. 13,8 ,, ,,	
d)	8,0 : 3,2 = 2,5	i. e. 14,8 ,, ,,	
e)	12,3 : 3,2 = 3,9	i. e. 23,0 ,, ,,	

Man sieht ein Ansteigen der Desintegration je nach der Konzentration der verwendeten Säure. Dieser Vorgang muß sich *gleichmäßig* auf alle Aminosäuren des Caseins erstrecken, da ein bevorzugtes Verbleiben im Eiweißverbande, etwa von Tyrosin und Tryptophan, natürlich ein viel stärkeres Ansteigen des Nitrowertes bei höherer Säurekonzentration zur Folge haben müßte, als nach den oben mitgeteilten Versuchen (s. auch die folgende Arbeit) gefunden wurde.

X. Das Nitroprodukt des Blutfibrins.

Als dritter Eiweißkörper wurde das Blutfibrin der Nitrierung unterworfen. Das getrocknete Produkt wurde vor dem Versetzen mit HNO_3 erst einige Stunden in 0,5proz. HNO_3 zum Quellen gebracht; die Substanz färbt sich bei der dann in gewohnter Art vorgenommenen Nitrierung rötlich, die Säure gelb; erstere wird auf der Nutsche NO_3-frei gewaschen und getrocknet. Während der Nitrowert für ursprüngliches Fibrin in die Fehlergrenzen fällt, gab das Nitroprodukt hier, wie beim Casein, zunächst einen auffallend hohen Wert (z. B. für 2 g Substanz 0,057 g NO_2), der sich mit der Berechnung auf Grund des (wahrscheinlichsten) Tyrosins- bzw. Tryptophangehaltes nicht in Übereinstimmung bringen ließ. Als, analog wie beim Casein, 5proz. HNO_3 (statt 20proz.) zur Nitrierung verwendet wurde, ergaben sich vollkommen ungleichmäßige Nitrowerte für die einzelnen Bestimmungen. Die Ursache dieses Verhaltens lag wieder in der Verankerung von NO_3-Gruppen im Eiweißkörper, die durch Quellen der Substanz in 1proz. Na_2CO_3-Lösung beseitigt werden konnten. Es wurde dabei genau wie beim Nitrocasein verfahren, die alkalische Lösung zeigt wieder deutliche HNO_3-Reaktion; die mit HCl angesäuerten Produkte werden sorgfältig ausgewaschen.

Es ergaben sich die folgenden Nitrowerte für je 2 g Substanz bei Nitrierung mit:

5proz. HNO_3	0 g	NO_2
10 „ „	0,015 g	„
20 „ „	0,040, 0,040, 0,041 g	„
nach den zweiten Quellen	0,039 g	„
30proz. HNO_3	0,045, 0,047 g	„
40 „ „	0,043 g	„

Die Nitrierung setzt also nach diesen Versuchen mit 10proz. HNO_3 ein und gelangt bei Verwendung von 20proz. HNO_3 auf die Werte von 0,040 bis 0,045 g NO_2, die sie auch bei Anwendung von 30- und 40proz. HNO_3 nicht mehr übersteigt.

Der *berechnete* Wert[1]) für einen Tyrosingehalt von 5 Proz.[2]) im Blutfibrin wäre für 2 g: 0,025 NO_2, bleibt also erheblich hinter den gefundenen Zahlen zurück; rechnet man einen Tryptophangehalt von 3,7 Proz. = 0,018 g NO_2 hinzu, so erhöht sich der Wert auf 0,043, die Übereinstimmung ist nun eine ziemlich befriedigende. *Der relativ hohe Tryptophangehalt des Blutfibrins läßt die Beteiligung dieser Aminosäure hier besonders deutlich hervortreten.*

---

[1]) Vgl. *Fürth* und *Fleischmann* (l. c.); *Folin* und *Looney* (l. c.).

[2]) Neue Bestimmungen in diesem Laboratorium siehe Fußnote S. 547.

Zusammenfassung.

1. Der Verlauf der Nitrierung bei Seidenfibroin, Casein und Blutfibrin wurde nach dem etwas modifizierten Verfahren von *Desvergnes* (bzw. *Young* und *Swain*) studiert.

2. Es zeigte sich bei allen drei Proteinen ein Nitrowert, der der einfachen (Mono-) Nitrierung des in der Eiweißmolekel enthaltenen Tyrosins entspricht.

3. Enthält das Protein auch Tryptophan, so addiert sich hierzu noch der entsprechende Nitrowert für diese Aminosäure. (Der Tryptophanbaustein als solcher braucht dabei nach der Nitrierung nicht mehr vorhanden zu sein; es ist wohl möglich, daß nur ein Teil der Tryptophanmolekel, mit der Nitrogruppe beladen, den Nitrowert des Proteins mitbestimmt.)

4. Beim Casein und Blutfibrin (s. auch die folgende Arbeit) müssen die bei der Nitrierung im Protein verankerten NO_3-Gruppen, die einen höheren Nitrowert vortäuschen, vor der Bestimmung durch eventuell wiederholtes Quellen in 1proz. Na_2CO_3-Lösung entfernt werden.

5. Das Nitrofibroin und Nitrocasein lassen sich durch überschüssiges Natriumhyposulfit im Wasserstoffstrome zu farblosen Produkten reduzieren.

6. Das vom Casein herstammende Reduktionsprodukt wurde, ebenso wie ursprüngliches Casein und Nitrocasein, nach der Methode von *van Slyke* auf den Amino-N-Wert untersucht. Es ergab sich bei dem Reduktionsprodukte eine geringfügige Erhöhung gegenüber dem Casein, doch keine Erhöhung gegenüber dem Nitrocasein. Es sind also bei der Reduktion keine neuen freien Aminogruppen wirksam geworden, die Bildung eines „Aminocaseins" ist nicht erfolgt; infolgedessen konnte auch bei der Diazotierung des Reduktionsproduktes ein brenzcatechinartiger Stoff nicht nachgewiesen werden.

7. Es wurde schließlich mit Hilfe der Methode von *van Slyke* der Verlauf der Desintegration bei der Nitrierung verfolgt. Es ergibt sich ein sehr langsames Ansteigen der Desintegration mit der verwendeten Säurekonzentration; auch bei Verwendung von konzentrierter Salpetersäure (60proz.) übersteigt dieselbe nur wenig 20 Proz.

Herrn cand. med. *L. Brings*, der mehrere NO_2-Bestimmungen durchgeführt hat, sage ich hierfür meinen besten Dank.

Über die Nitrierung einiger Eiweißkörper. II.

Von

Fritz Lieben.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Wien.)

(Versuche mit **Ludwig Brings**.)

(Eingegangen am 11. Januar 1924.)

In der vorangehenden Arbeit gelangte ich zu einer Vorstellung vom Verlaufe der Nitrierung von Eiweißkörpern, wonach der Nitrowert sich auf einer Höhe einstellt, der einer Mononitrierung des in der Eiweißmolekel enthaltenen Tyrosins entspricht. Ist im Protein auch Tryptophan vorhanden, so addiert sich hierzu noch der Mononitrowert für das Tryptophan. Dieser Wert konnte bei Salpetersäurekonzentrationen zwischen 20 und 40 Proz. bei Seidenfibroin, Casein und Blutfibrin festgestellt werden.

Um diese Konstatierung zu einer für die wichtigsten Proteine gültigen Regel erweitern zu können, war es nötig, einige weitere Beispiele heranzuziehen. Im folgenden wird der Verlauf der Nitrierung beim Serumalbumin und Serumglobulin, Lactalbumin, Edestin, Gliadin und Keratin beschrieben.

1. *Serumalbumin.* In schwach gefärbtem Pferdeserum wird durch Halbsättigung mit heißgesättigter Ammonsulfatlösung das Globulin gefällt, abfiltriert, im Filtrat das Albumin durch *Auskoagulieren* niedergeschlagen, filtriert und mit Wasser SO_4''-frei gewaschen; das Produkt wurde getrocknet und pulverisiert. Je 8 g wurden nun mit je ½ Liter 20-, 30- und 40proz. HNO_3 versetzt und über Nacht stehengelassen. Die 40proz. Säure wirkte lösend auf das Albumin, bei Neutralisieren setzte sich wohl ein spärlicher Niederschlag ab, jedoch blieb nach der

Behandlung mit 1proz. Sodalösung usw. (s. die vorangehende Arbeit) zu wenig für eine Bestimmung übrig.

Das mit 20proz. HNO_3 behandelte Produkt gab für 2 g und 10 ccm vorgelegter Zinnchlorürlösung (s. die vorangehende Arbeit) nach zweimaligem Quellen in 1proz. Na_2CO_3 einen Verbrauch von 40 ccm n/10 J, 40 . F (= 0,0007655) = **0,031 g NO_2**, eine zweite Probe gab dasselbe Resultat.

Die mit 30proz. HNO_3 versetzte Substanz gab nach dem ersten Quellen einen Verbrauch von 49, nach dem zweiten Quellen von 45 ccm n/10 J, i. e. **0,034 g NO_2**.

Der Tyrosingehalt des Serumalbumins steht noch nicht fest, er dürfte sich um 5 Proz. herum bewegen[1]), der Tryptophangehalt darf mit 1,5 Proz. angenommen werden; für 2 g Substanz ergeben sich für Tyrosin zu 5 Proz. und Tryptophan zu 1,5 Proz: 0,025 + 0,007 = **0,032 g NO_2**.

2. *Serumglobulin.* Der Niederschlag, aus Serum durch Halbsättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ gewonnen, wird in siedendem Wasser koaguliert, dann SO_4''-frei gewaschen und getrocknet. Je 10 g Substanz wurden mit je ½ Liter 20- und 30proz. HNO_3 angesetzt. Gegen 40proz. Säure verhielt sich das Globulin dem Albumin analog.

2 g des Produktes aus 20proz. HNO_3 gaben nach der Sodabehandlung einen Verbrauch von 75 ccm n/10 J, nach dem zweiten Quellen von 64 ccm n/10 J, i. e. **0,049 g NO_2**, nach dem dritten Quellen von 59 ccm n/10 J i. e. **0,045 g NO_2**, eine zweite Bestimmung gab erst einen Verbrauch von 58 ccm, dann von 61 ccm n/10 J i. e. **0,044** bzw. **0,047 g NO_2**.

2 g des Produktes aus 30proz. HNO_3 lieferten 59 ccm n/10 J, i. e. **0,045 g NO_2**.

Berechnung:	Globulin zu	6,5 Proz.	Tyrosin	0,033 g NO_2
	„ „	3 „	Tryptophan .	0,014 g „
				0,047 g NO_2

3. *Lactalbumin.* 5 g des Präparates „Albulaktin“, das wir der Freundlichkeit des Herrn Dozenten Dr. *E. Nobel* verdanken, wurden mit 200 ccm 20proz. HNO_3 angesetzt, dann wie gewöhnlich in 1proz. Na_2CO_3 gequollen; das getrocknete Produkt ergab für je 1 g einen Verbrauch von 20 bzw. 22 ccm n/10 J. Für 2 g Substanz ergibt sich im Mittel 42 . F = **0,032 g NO_2**.

Berechnung: Lactalbumin, mit 5 Proz. Tyrosin und 2,3 Proz. Tryptophan angenommen, ergibt 0,025 + 0,010 = **0,035 g NO_2**.

[1]) *O. Folin* und *J. M. Looney*, Journ. of biol. Chem. **51**, 421.

4. *Edestin.* 400 g Hanfsamen[1]) werden im Mörser pulverisiert, dann im Soxhletapparat mit Petroläther entfettet, letzterer wird im trockenen Luftstrom vertrieben. Das erhaltene Samenmehl wird mit 3proz. NaCl-Lösung auf dem Wasserbade bei 60° extrahiert (Portionen von je 100 g auf 500 ccm NaCl-Lösung); der Auszug wird von Samenrückständen filtriert; Edestin scheidet sich in der Kälte ab, der Niederschlag wird abfiltriert, in einer Porzellanschale getrocknet, zerrieben und dann durch Auswaschen mit Wasser von NaCl befreit.

Portionen von 3 g wurden mit 20- und 30proz. HNO_3 angesetzt usw.; der Verbrauch für 2 g Substanz betrug im ersten Falle 44 ccm n/10 J, i. e. **0,034 g NO_2**, im zweiten Falle 47 ccm n/10 J, i. e. **0,036 g NO_2**.

Berechnung:	Edestin mit 6 Proz. Tyrosin angenommen	0,030 g NO_2
	,, ,, 1,6 ,, Tryptophan ,,	0,007 g ,,
		0,037 g NO_2

5. *Gliadin.* ½ kg Weizenmehl[2]) wird mit dem fünffachen Gewicht 70proz. Alkohols in vier Portionen nach Durchmischung 24 Stunden stehengelassen; dann vom restlichen Mehl durch Papierbrei klar filtriert. Aus dem Filtrat wird der Alkohol auf dem Wasserbade im Vakuum abdestilliert, die eingeengte Lösung nun in kalte gesättigte Kochsalzlösung gegossen, vom spärlichen Niederschlag dekantiert, dieser schließlich gesammelt und getrocknet.

Mit 20proz. HNO_3 angesetzt und wie oben weiter behandelt, verbraucht 1 g „Nitrogliadin" 13 ccm bzw. 2 g 26 ccm n/10 J, i. e. **0,020 g NO_2**.

Berechnung:	Gliadin mit 3,5 Proz. Tyrosin angenommen	0,017 g NO_2
	,, ,, 1,5 ,, Tryptophan ,,	0,007 g ,,
		0,024 g NO_2

6. *Keratin.* Die Bestimmung der Nitrogruppen bei Keratinen bietet insofern Schwierigkeiten, als diese Proteinoide nicht einheitliche Substanzen darstellen. Daher unterliegt der für die vorliegende Bestimmung maßgebende Tyrosin- und Tryptophangehalt je nach der Herkunft des Produktes bedeutenden Schwankungen. Die folgenden Daten sollen nur zeigen, daß die Bestimmungsmethode prinzipiell auch bei Keratinen anwendbar ist, ohne daß der „Nitrowert" Anspruch erheben würde, für ein anderes Produkt zu gelten als das eben von uns untersuchte. — ½ kg Gänsefedern wurde portionenweise im Soxhletapparat mit Petroläther entfettet, dann je 20 g mit je ½ Liter 10-, 20-, 30- und 40proz. HNO_3 angesetzt.

Die Ergebnisse waren für je 2 g Substanz: Bei Verwendung von 10proz. HNO_3 ohne folgende Quellung wurden verbraucht 13 ccm n/10 J, i. e. 0,010 g NO_2.

[1]) Vgl. *Th. B. Osborne* und *E. Strauss*, in Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. I, Teil 8, 1922, S. 400.

[2]) Ebendaselbst, S. 438.

Beim Ansatz mit:

20proz. HNO_3	ohne Quellung	27 ccm	n/10 J	i. e.	0,021 g	NO_2
20 ,, ,,	nach erfolgter Quellung	30 ,,	n/10 J	i. e.	**0,023** g	,,
30 ,, ,,	ohne Quellung	55 ,,	n/10 J	i. e.	0,042 g	,,
30 ,, ,,	nach 1maliger Quellung	46 ,,	n/10 J	i. e.	0,035 g	,,
30 ,, ,,	,, 2 ,, ,,	33 ,,	n/10 J	i. e.	**0,025** g	,,
30 ,, ,,	., 3 ,, ,,	32 ,,	n/10 J	i. e.	**0,025** g	,,
40 ,, ,,	,, 1 ,, ,,	45 ,,	n/10 J	i. e.	0,034 g	,,
40 ,, ,,	,, 2 ,, ,,	36 ,,	n/10 J	i. e.	**0,028** g	,,
40 ,, ,,	,, 3 ,, ,,	39 ,,	n/10 J	i. e.	**0,030** g	,,

Das mit 10proz. HNO_3 behandelte Produkt wurde mit 20proz. HNO_3 nochmals angesetzt. Der Jodverbrauch stieg jetzt auf 31 ccm, i. e. **0,023 g NO_2**.

Es ergibt sich mithin, daß, namentlich bei Verwendung *höherer* HNO_3-Konzentrationen, eine *wiederholte Behandlung mit 1proz. Sodalösung* nötig ist, um zu einem konstanten Werte zu gelangen, dieser kann etwa für das vorliegende Nitrokeratin mit **0,026 g NO_2** angenommen werden.

Den in der Literatur angegebenen, naturgemäß voneinander stark abweichenden Werten für den Tyrosingehalt von Keratinen konnte für den vorliegenden Fall keine Bedeutung zukommen.

Herr cand. med. *A. Fischer* hatte die Freundlichkeit, nach einem hier im Institut ausgearbeiteten Verfahren, das auf der *Millon*schen Reaktion beruht, in den von mir verwendeten Gänsefedern eine Tyrosinbestimmung vorzunehmen. Er fand 3 bis 3½ Proz., einen gegenüber den in der Literatur angegebenen auffallend niedrigen Wert. Es waren allerdings schon früher im hiesigen Institut Werte von 4,5 bis 5 Proz. beobachtet worden [nach dem Verfahren von *Folin* und *Looney* (l. c.), sowie nach dem Diazoverfahren von *Hanke* und *Koessler*[1])]. Es lag also kein Grund vor, einen höheren Wert anzunehmen.

Unter der Annahme von 4 Proz. Tyrosin wäre der Nitrowert 0,020 g NO_2, und der weiteren von 1 Proz. Tryptophan **0,005 g NO_2**, in Summe 0,025 g NO_2

Es zeigt sich mithin durchweg eine befriedigende Übereinstimmung zwischen Berechnung und experimentellem Befund. Diese Übereinstimmung erscheint allerdings durch die geringe Sicherheit der ersteren gefährdet, die derzeit nur auf einer *Auswahl* unter den bisher bekannten Werten für den Tyrosin- und Tryptophangehalt der Proteine fußen kann.

Während die Tryptophanbestimmung nach der von *O. Fürth* und *Z. Dische* (noch unveröffentlicht) revidierten kolorimetrischen Methode (vgl. Anm. 1, S. 543 der vorigen Arbeit), sowie nach der Methode von *Folin* und *Looney* (l. c.) gut übereinstimmende, ziemlich gesicherte

---

[1]) *M. T. Hanke* und *K. K. Koessler*, Journ. of biol. Chem. **50**, **238**, 1922.

Resultate gibt, bietet ein Überblick über die in der Literatur vorliegenden Tyrosinwerte (*O. Fürth*, diese Zeitschr.) das Bild der größten Diskrepanzen. Ich hielt mich nun für berechtigt, die Werte von *M. Weiss*[1]) nach dem Millonverfahren sowie die aus gravimetrischen Bestimmungen als bestimmt zu niedrig, die Werte nach dem Verfahren von *Thomas*[2]) (Indexe phénolique) als bestimmt zu hoch auszuschalten und mich an die in der Tabelle von *Fürth* angeführten mittleren Werte nach den Methoden von *Fürth* und *Fleischmann*, *Folin* und *Looney* usw. zu halten. Die Zukunft wird lehren, ob ich dabei irgendwo beträchtlich fehlgegriffen habe. Nach den bisherigen Befunden kann man wohl an der eingangs erwähnten Konstatierung als *Regel für den Verlauf der Nitrierung* festhalten.

---

[1]) *M. Weiss*, diese Zeitschr. **97**, 102.

[2]) *P. Thomas*, Bull. de la Soc. de Chimie Biol. **8**, 18, 1921.

Autorenverzeichnis.

